

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion  
ausgewählter Polyketidsynthasen**

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades einer**

**Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte**

**Dissertation**

**von Maren Lütge**

**aus Hannover**

1. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues  
2. Referent: Privatdozent Dr. Bernd Schneider  
eingereicht am: 30.11.2011  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.02.2012

Druckjahr 2012

**Vorveröffentlichung der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

**Publikation:**

**Tim Klundt, Marco Bocola, Maren Lütge, Till Beuerle, Benye Liu and Ludger Beerhues**

„A Single Amino Acid Substitution Converts Benzophenone Synthase into Phenylpyrone Synthase“, *Journal of Biological Chemistry* 284, 30957-30964, 2009

**Tagungsbeitrag in Form eines Vortrags:**

**M. Lütge**

„A Single Amino Acid Substitution Converts Benzophenone Synthase into Phenylpyrone synthase“

DPHG-Doktorandentagung 2009, Schloss Pichlarn, Irdning

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1 Allgemeine Einführung .....	10
1.2 Superfamilie der Polyketidsynthasen .....	12
1.3 Biphenylsynthase aus <i>Sorbus aucuparia</i> .....	15
1.4 Benzophenonsynthase aus <i>Hypericum androsaemum</i> .....	18
1.5 Phenylphenalenone und ihre Synthese in <i>Wachendorfia thyrsiflora</i> .....	20
1.6 Zielsetzungen .....	26
<b>2 Material .....</b>	<b>27</b>
2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer .....	27
2.1.1 Chemikalien .....	27
2.1.2 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie.....	28
2.1.3 Lösungen und Puffer für biochemische Untersuchungen.....	29
2.1.4 Lösungen und Puffer für die Kristallisierung .....	32
2.1.5 Antibiotika .....	32
2.1.6 Enzyme .....	32
2.1.7 Bakterienstämme und Plasmide .....	33
2.1.8 Primer.....	33
2.2 Geräte .....	34
<b>3 Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.1 Methoden der Molekularbiologie.....	35
3.1.1 Anzucht und Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	35
3.1.2 Lagerung von <i>E. coli</i> -Kulturen .....	35
3.1.3 Keimzahlbestimmung .....	36
3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation).....	36
3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
3.1.6 Restriktion durch Typ-II-Endonukleasen .....	38
3.1.7 Agarosegelelektrophorese.....	38
3.1.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	39
3.1.9 Ligation .....	39
3.1.10 Transformation in <i>E. coli</i> .....	39
3.1.11 Insertionskontrolle .....	40
3.1.12 Proteinexpression.....	40
3.1.13 Zellaufschluss .....	40
3.2 Methoden der Biochemie .....	40
3.2.1 Affinitätschromatographie .....	40
3.2.1.1 Reinigung über Ni-NTA-Agarose.....	40
3.2.1.2 Reinigung über Streptavidin-Agarose.....	41
3.2.2 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen .....	41
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
3.2.4 Proteingele .....	43



3.2.4.1	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	43
3.2.4.2	Native Proteingele .....	44
3.2.5	Färben der Proteingele .....	45
3.2.6	Dokumentation der Proteingele .....	45
3.2.7	Konzentrieren der Proteinlösung für die Kristallisation .....	45
3.2.8	Lagerung gereinigter Proteine .....	45
3.2.9	Abspalten des Polyhistidinrestes für die Kristallographie .....	45
3.2.9.1	Abspalten des Polyhistidinrestes mit Thrombin .....	46
3.2.9.2	Abspalten des Polyhistidinrestes mit TEV-Protease .....	46
3.2.10	Proteinreinigung mittels Gelfiltration (FPLC) .....	47
3.3	Methoden der Analytik .....	47
3.3.1	Inkubationen .....	47
3.3.1.1	Standardinkubationen .....	47
3.3.1.2	Inkubationen für Inhibitionsversuche .....	48
3.3.1.3	Inkubationen zur Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums .....	49
3.3.1.4	Co-Inkubationen mit Wt PKS1 und Wt PKS2 .....	50
3.3.2	High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) .....	50
3.3.3	LC-ESI-MS .....	51
3.3.4	NMR .....	52
3.4	Methoden der Proteinkristallisierung .....	53
3.4.1	Kristallisierung .....	53
3.4.1.1	Kristallisation nach der „sitting drop“ Methode .....	53
3.4.1.2	Kristallisation nach der „hanging drop“ Methode .....	54
3.4.2	Kapillarkristallisierung .....	55
3.4.3	Seeding .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
4.1	Co-Inkubation von WtPKS1 und WtPKS2 .....	57
4.1.1	Identifizierung gebildeter Diarylheptanoide .....	57
4.1.1.1	Inkubationen mit 4-Cumaroyl-CoA .....	57
4.1.1.2	Inkubationen mit Cinnamoyl-CoA .....	59
4.1.1.3	Inkubation mit Cinnamoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA .....	61
4.1.1.4	Inkubationen mit Diketidyl-NAC-Estern .....	62
4.1.2	Bestimmung des Temperaturoptimums .....	64
4.1.3	Bestimmung des pH-Optimums .....	65
4.1.4	Bestimmung kinetischer Parameter .....	66
4.1.4.1	Malonyl-CoA .....	66
4.1.4.2	4-Cumaroyl-CoA .....	67
4.1.4.3	Cinnamoyl-CoA .....	68
4.1.5	Verhalten von PKS in nicht-denaturierenden Proteingelen .....	69
4.2	Kristallisierung .....	70
4.2.1	Expression der Biphenylsynthase .....	70
4.2.1.1	Expression im Vektor pET28c .....	71
4.2.1.2	Expression im Vektor pRsetB .....	72
4.2.2	Aufreinigung der BIS .....	73

4.2.2.1	Reinigung über Ni-NTA-Agarose.....	73
4.2.2.2	Schneiden des His <sub>6</sub> -Tags mit Thrombin .....	73
4.2.2.3	Schneiden des His <sub>6</sub> -Tags mit TEV-Protease.....	74
4.2.3	Kristallisierung der Biphenylsynthase .....	75
4.2.3.1	Kristallisierung von Thrombin-geschnittener BIS1 .....	76
4.2.3.2	Kristallisierung von ungeschnittener BIS .....	78
4.2.3.3	Kristallisierung von TEV-geschnittener BIS .....	79
4.2.3.4	Kristallisierung von TEV-Protease-geschnittener und verkürzter BIS1 82	
4.2.4	Expression und Reinigung der Benzophenonsynthase .....	82
4.2.5	Kristallisierung der Benzophenonsynthase.....	83
4.2.5.1	Kristallisierung von Thrombin-geschnittener BPS .....	83
4.2.5.2	Kristallisierung von ungeschnittener BPS .....	86
4.3	Inhibitionsversuche zur BPS-Mutante T135L.....	87
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>90</b>
5.1	Medizinische Bedeutung von Phenylphenalenonen.....	90
5.2	Die Biosynthese der Diarylheptanoide in <i>Wachendorfia thyrsiflora</i> .....	90
5.3	Kristallisierung der Biphenylsynthase und der Benzophenonsynthase.....	95
5.4	Inhibitionsversuche .....	96
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
6.1	Diarylheptanoidsynthese .....	99
6.2	Kristallisierung .....	99
6.3	Inhibitionsversuche .....	99
	<b>Quellen .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>104</b>
	<b>Kristallisationspuffer .....</b>	<b>104</b>
7.1	Puffer zur Kristallisierung von der Firma Jena Bioscience.....	104
7.1.1	JBScreen classic 1 .....	104
7.1.2	JBScreen classic 2.....	104
7.1.3	JBScreen classic 3.....	105
7.1.4	JBScreen classic 4.....	106
7.1.5	JBScreen classic 5.....	106
7.1.6	JBScreen classic 6.....	107
7.1.7	JBScreen classic 7 .....	107
7.1.8	JBScreen classic 8.....	108
7.1.9	JBScreen classic 9.....	109
7.1.10	JBScreen classic 10.....	109
7.1.11	JBScreen JCSG ++ 1 .....	110
7.1.12	JBScreen JCSG ++ 2 .....	111
7.1.13	JBScreen JCSG ++3 .....	111
7.1.14	JBScreen JCSG ++ 4 .....	112
7.2	Puffer zur Kristallisierung von der Firma Sigma .....	113
7.2.1	Sigma Basic Kit .....	113

---

7.2.2	Sigma Cryo Kit .....	114
7.2.3	Sigma Low Ionic.....	115
7.2.4	Sigma Membrane Proteins.....	116
7.2.5	Sigma Extension Kit .....	117
7.3	Kristallisationspuffer von der Firma Hampton Research.....	118
7.3.1	Crystal Screen .....	118
7.3.2	Crystal screen 2.....	120
7.4	Kristallisationspuffer vom Institut für Physikalische Biotechnologie, Halle121	
7.4.1	House factorials .....	121
7.5	Kristallisationspuffer von der Firma Molecular Dimensions.....	123
7.5.1	Molecular Dimensions Mem Plus.....	123
7.5.2	Molecular Dimensions Mem Start.....	125
7.5.3	Molecular Dimensions Mem Sys.....	127
7.5.4	Molecular Dimensions Mem Gold .....	128
7.5.5	Molecular Dimensions Morpheus.....	130
7.6	Pipettierschema für den Roboter bei “sitting drop” Methode .....	132

## Abkürzungen

Å	Angström
Abb.	Abbildung
BIS	Biphenylsynthase
BPS	Benzophenonsynthase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DAD	Photodioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
FPLC	Fast protein liquid chromatographie
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
H.a.	Hypericum androsaemum
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid
K <sub>m</sub>	Michaelis Konstante
M	Molare Masse
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min.	Minute
mM	Millimolar
MW	Molekulare Masse
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PKS	Polyketidsynthase
RT	Raumtemperatur

S.a.	Sorbus aucuparia
sec.	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	super optimal broth medium
STS	Stilbensynthase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
VIS	Sichtbares Licht

## AMINOSÄUREN

<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanin
<b>C</b>	<b>Cys</b>	Cystein
<b>D</b>	<b>Asp</b>	Asparaginsäure
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Glutaminsäure
<b>F</b>	<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glycin
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidin
<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucin
<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lysin
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucin
<b>M</b>	<b>Met</b>	Methionin
<b>N</b>	<b>Asn</b>	Asparagin
<b>P</b>	<b>Pro</b>	Prolin
<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamin
<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginin
<b>S</b>	<b>Ser</b>	Serin
<b>T</b>	<b>Thr</b>	Threonin
<b>V</b>	<b>Val</b>	Valin
<b>W</b>	<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tyrosin

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele pharmazeutisch wichtiger, mikrobieller Polyketide. A-Doxorubicin, B-Tetracyclin, C-Lovastatin, D-Sirolimus (Rapamycin), E-Erythromycin A, F-Nystatin .	11
Abbildung 2: Beispiele pharmazeutisch wichtiger Pflanzlicher Polyketide. A, Rutin; B, Silibinin; C, Anthrachinon-Grundgerüst (R=H= Anthrachinon) ; D, Hyperforin.....	12
Abbildung 3: Von Polyketidsynthasen katalysierte Cyclisierungsreaktionen. BIS, Biphenylsynthase; BPS Benzophenonsynthase; T135L Punktmutante der BPS.....	14
Abbildung 4: Überlagerung der BIS1-Raumstruktur im Bereich des aktiven Zentrums mit der Elektronendichtekarte. In Nachbarschaft zum katalytischen Cystein-161 liegen die rot dargestellten Elektronenwolken der eingelagerten Sauerstoffmoleküle (nach Raeth, 2007)	17
Abbildung 5: BIS1 aus <i>Sorbus aucuparia</i> im Vergleich mit der CHS aus <i>Medicago sativa</i> (links) und der STS aus <i>Pinus sylvestris</i> (rechts) (nach Raeth, 2007).....	17
Abbildung 6: HPLC-Analyse der BPS-Wildtyp-Produkte (a,c) und der T135L Mutante (b,d) mit Benzoyl-CoA (a,b) und 3-Hydroxybenzoyl-CoA (c,d) als Startersubstrate .....	20
Abbildung 7: Phenylphenalenone ohne Sauerstoff in 5- und 6- Position A, Anigorufon; B, Methoxyanigorufon; C, 4-Phenyl-benzo[de]isochromen-1,3-dion; D, Anigorootin.....	21
Abbildung 8: Phenylphenalenone mit Sauerstoff in 5- und /oder 6-Position E, Haemodrin; F, 5-Hydroxy-2-methoxy-6-oxa-benzo[de]chrysen-1-on; G, 5-Methoxy-6-oxa-benzo[de]chrysen-1-on; H, 2,5-Dihydroxy-6-oxa-benzo[de]chrysen-1-on; I, 6-O[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenyl-phenyl-1-on .....	21
Abbildung 9: Phenylphenalenone mit Sauerstoff im Ring (Phenylisochromenone) J, 5-Hydroxy-3,6-dimethoxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on; K, 5-Methoxy-7-phenyl-benzo[de]isochromen-1-on; L, 6-O[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-5-methoxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on; M, 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-(p-hydroxy-phenyl)-3H-[de]isochromen-1-on; N, 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on.....	22
Abbildung 10: Vorgeschlagerener Reaktionsmechanismus der Phenylphenalenon-Synthese (nach Brand, 2005).....	23
Abbildung 11: Biosynthese des Bisdesmethoxycurcumins ; (Morita et al., 2007; Katsuyama et al., 2009)	25
Abbildung 12: Reaktion von WtPKS1 mit 4-Cumaroyl-CoA als Starter.....	26
Abbildung 13: Schematische Darstellung des „sitting drop“ Verfahrens.....	54
Abbildung 14: Schematische Darstellung des „sitting drop“ Verfahrens .....	54
Abbildung 15: Schematische Darstellung des „hanging drop“ Verfahrens ( nach Holbrook et al., 2010)	55
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Kapillarmethode (Hampton Research).....	56
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm einer Inkubation mit Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA (404 nm). 1, p-Hydroxybenzalacetone; 2, p-Hydroxystyrylpyron; 3, Desdesmethoxycurcumin..	58
Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm der Referenz Bisdesmethoxycurcumin (404 nm) .....	58
Abbildung 19: Co-Chromatographie von 20 ng authentischem Bisdesmethoxycurcumin mit einem Parallelansatz aus Abb. 16 A.....	59
Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm einer Inkubation mit Malonyl-CoA und Cinnamoyl-CoA vor Änderung des Gradienten (390 nm).....	60
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm der Referenz 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on nach Änderung des Gradienten (390 nm).....	60
Abbildung 22: Co-Chromatographie des Produkts Cinnamoyl-CoA mit 400 ng authentischer Referenz (390 nm).....	62
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm der Inkubation mit 4-Cumaroyl-CoA und Cinnamoyl-CoA Co-Chromatographie des Produkts Cinnamoyl-CoA mit 400 ng authentischer Referenz (390 nm).....	61
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm der Referenz 5-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-1,4,6-trien-3-on.....	62
Abbildung 25: Bestimmung des Temperaturoptimums der WtPKS1/WtPKS2-katalysierten Reaktion .....	65
Abbildung 26: Bestimmung des pH-Optimums der WtPKS1/WtPKS2-katalysierten Reaktion.....	66
Abbildung 27: Michaelis-Menten-Diagramm für Malonyl-CoA.....	67
Abbildung 28: Abbildung des Hanes-Plots für Malonyl-CoA.....	67
Abbildung 29: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration ....	68

Abbildung 30: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration im Bereich 0-200 $\mu\text{M}$ .....	68
Abbildung 31: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Cinnamoyl-CoA-Konzentration.....	69
Abbildung 32: Natives Gel mit unterschiedlichen Polyketidsynthasen und ihren Mischungen 1, BPS und WtPKS1; 2, BPS und WtPKS2; 3, BPS allein; 4, WtPKS1 allein; 5, WtPKS2 allein; 6, WtPKS1 und WtPKS2; 7, WtPKS1 und WtPKS2 in doppelter Konzentration; 8, WtPKS1 und BIS1; 9, BIS1 allein; 10, BIS1 und WtPKS2; 11, WtPKS1 und CHS; 12, CHS allein; 13, CHS und WtPKS2 .....	70
Abbildung 33: Vektormappe des Expressionsvektors pET28c.....	71
Abbildung 34: Unterschiede in den Expressionsvektoren pET 28 a, b und c .....	72
Abbildung 35: SDS-Polyacrylamidgel zum Testen von verschiedenen Waschpufferkonzentrationen. In den roten Rechtecken sind Banden von Fremdproteinen zu sehen. ....	73
Abbildung 36: SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Reinheit von BIS1.....	74
Abbildung 37: SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle des Schneidens mit TEV-Protease .....	75
Abbildung 38: Für Kristallisationsversuche verwendete Konstrukte von BIS1 mit N-terminalem ÜberhangSDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle des Schneidens mit TEV-Protease.....	75
Abbildung 39: Kristallbilder der BIS1 nach der „sitting drop“ Methode, 1, nach einigen Minuten; 2, nach 12 Stunden; 3, nach 2 Tagen; 4, nach 4 Wochen.....	80
Abbildung 40: Kristallbilder (Zuordnung s. Tab .4.13).....	81
Abbildung 41: SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Reinheit von BPS.....	83
Abbildung 42: Kristallbildung unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen .....	85
Abbildung 43: Phenylpyronbildung durch die T135L Mutante der BPS nach Vorinkubation mit Malonyl-CoA und steigenden Konzentrationen von 3-Hydroxybenzoyl-CoA oder Acetyl-CoA. Die Kontrollansätze enthielten nur Protein oder Protein und Malonyl-CoA in der Vorinkubation .....	89
Abbildung 44: Reaktionsübersicht der Enzyme WtPKS1 und WtPKS2 mit verschiedenen Starter-CoA-Estern.....	91
Abbildung 45: Biosynthese von Anigorufon (nach Brand, 2005) .....	94
Abbildung 46: CHS-basierte Homologie-Modelle der aktiven Zentren von Wildtyp-BPS (a,c) und Mutante T135L (b,d). Das Benzoyl-Triketid (a,b) und das 3-Hydroxybenzoyl-Triketid sind kovalent an das Cys167 im aktiven Zentrum gebunden. Der Wildtyp katalysiert eine weitere Acetyl-Addition an das Triketid-Intermediat. In der Mutante werden die Triketide in eine neue Tasche geleitet, die keine weitere Elongation zulässt (nach Klundt et al., 2009).....	98

# 1 Einleitung

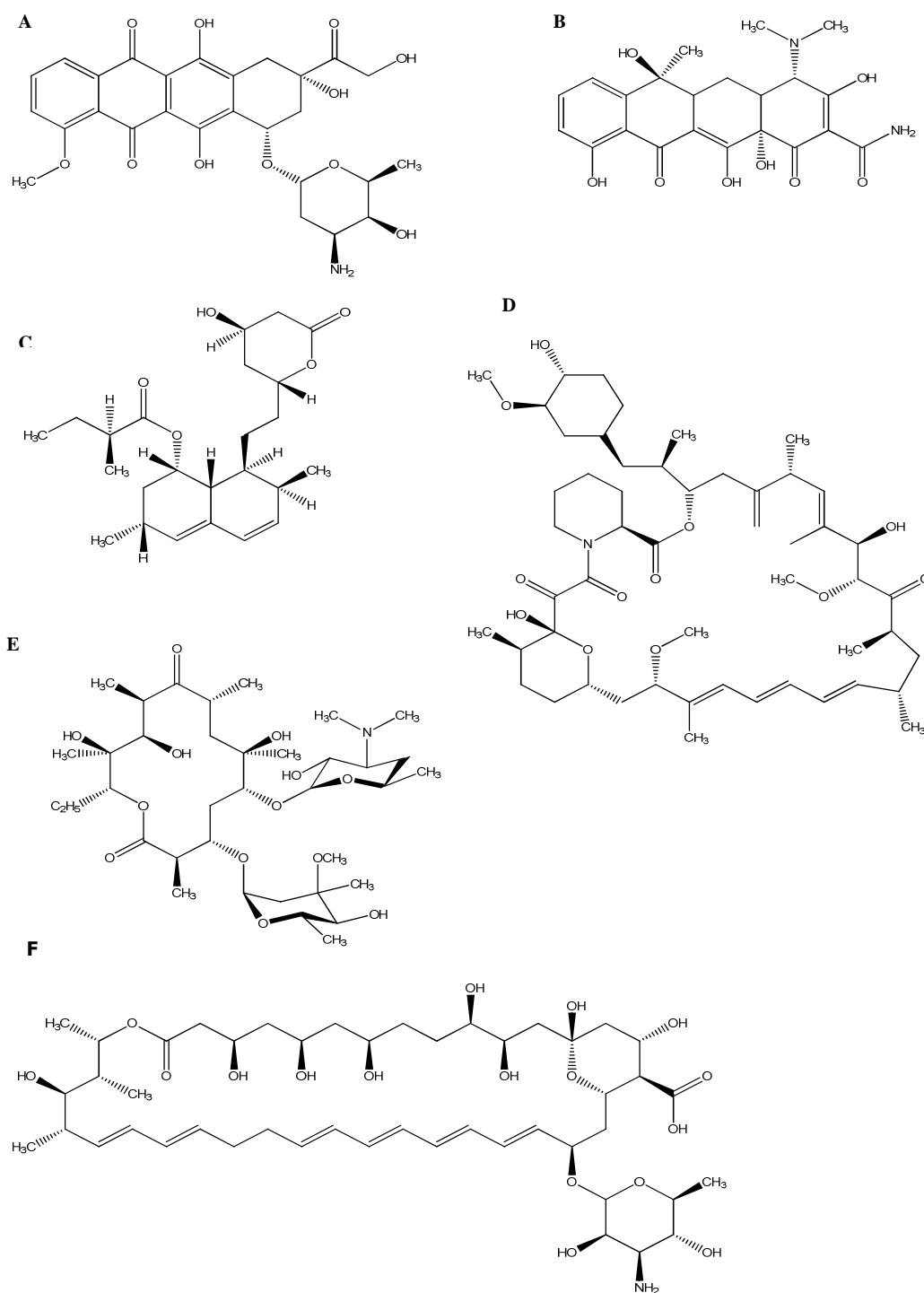
## 1.1 Allgemeine Einführung

Diese Arbeit behandelt verschiedene Polyketidsynthasen mittels unterschiedlicher biochemischer und molekularbiologischer Verfahren sowie Methoden zur Kristallisation, um einen detaillierten Einblick in ihre Funktionsweise zu erhalten. Polyketidsynthasen sind Enzyme, die an der Synthese einer Vielzahl kompliziert gebauter Sekundärstoffe beteiligt sind. Diese Sekundärstoffe sind in Pflanzen nicht für die primären Stoffwechselvorgänge notwendig, stellen allerdings einen für die Pflanze überlebenswichtigen Aspekt bei der Abwehr von Fressfeinden und dem Schutz gegen Umwelteinflüsse dar und können der Pflanze damit einen gewissen Selektionsvorteil bieten. So wirkt zum Beispiel das Stilben Resveratrol, welches unter anderem im Weizen vorkommt, fungizid, wodurch es möglich war, Pilzresistente Weizensorten durch gentechnische Veränderung zu züchten (Serazetdinova et al., 2005). Da die Polyketide meist einen großen Chromophor im Molekül aufweisen, sind sie häufig intensiv gefärbt, was sich vor allem in den Blüten von Pflanzen positiv auf die Bestäubung auswirkt. Außerdem können sie phototoxisch wirken, wie zum Beispiel Hypericine in Johanniskrautarten (Hypericaceae) und die Phenylphenalenone in Bananen (Musaceae) (Flors et al, 2006).

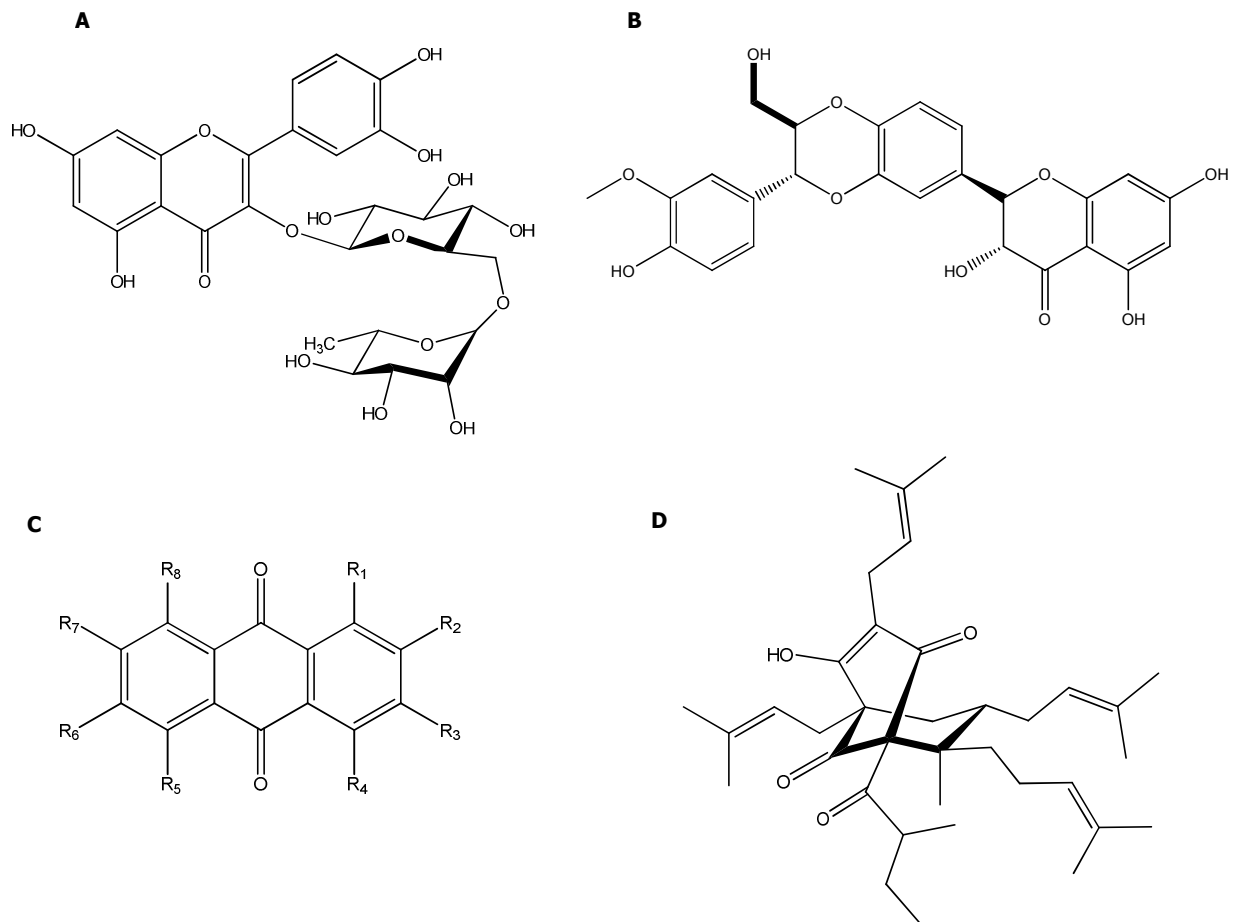
Da es sich bei den Polyketiden um hochwirksame Inhaltsstoffe handelt, lag es nahe, die Wirkungen auch am Menschen zu untersuchen. Heutzutage haben Polyketide, vor allem die aus Mikroorganismen, einen Anteil von etwa 18 Milliarden US-Dollar am Jahresumsatz der pharmazeutischen Industrie (Weissman et al., 2005). Die Wirkungen sind so vielseitig wie die Wirkstoffe. Tetracyclin und Erythromycin (Abb. 1) sind beispielsweise häufig eingesetzte Antibiotika und Nystatin ist ein Antimykotikum, das seit Jahren effektiv bei Windeldermatitis eingesetzt wird. Außerdem gibt es Polyketide, die gegen Krebs verwendet werden, wie das Doxorubicin. Gegen die Hypercholesterolemie, die im Rahmen einer zu fettreichen Ernährung auftritt und als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt, wird Lovastatin (Mevastatin) verschrieben und Sirolimus (=Rapamycin) wirkt immunsuppressiv. Unter den pflanzlichen Polyketiden werden Quercetin-Derivate wie das Rutin bei chronischer venöser Insuffizienz, Silibinin als Leberprotektivum und Anthrachinone bei Obstipation eingesetzt (Abb. 2). Die antidepressive Wirkung des Johanniskrauts beruht biochemischen und tierexperimentellen Untersuchungen zufolge auf dem Zusammenspiel mehrerer Wirkstoffklassen, wobei viele Untersuchungen darauf hindeuten, dass das Phloroglucin-Derivat Hyperforin (Abb. 2)



ein wesentlicher pharmakologischer Bestandteil ist (Chatterjee et al., 1998). Dies sind nur wenige Beispiele für die breit gefächerten Einsatzmöglichkeiten der Polyketide, daher liegt in der Erforschung der Biosynthese dieser Stoffklasse und der daran beteiligten Enzyme ein großes Potential für neue Therapiemöglichkeiten.



**Abbildung 1:** Beispiele pharmazeutisch wichtiger, mikrobieller Polyketide. **A**-Doxorubicin, **B**-Tetracyclin, **C**-Lovastatin, **D**-Sirolimus (Rapamycin), **E**-Erythromycin A, **F**-Nystatin



**Abbildung 2:** Beispiele pharmazeutisch wichtiger pflanzlicher Polyketide. **A**, Rutin; **B**, Silibinin; **C**, Anthrachi-non-Grundgerüst; **D**, Hyperforin

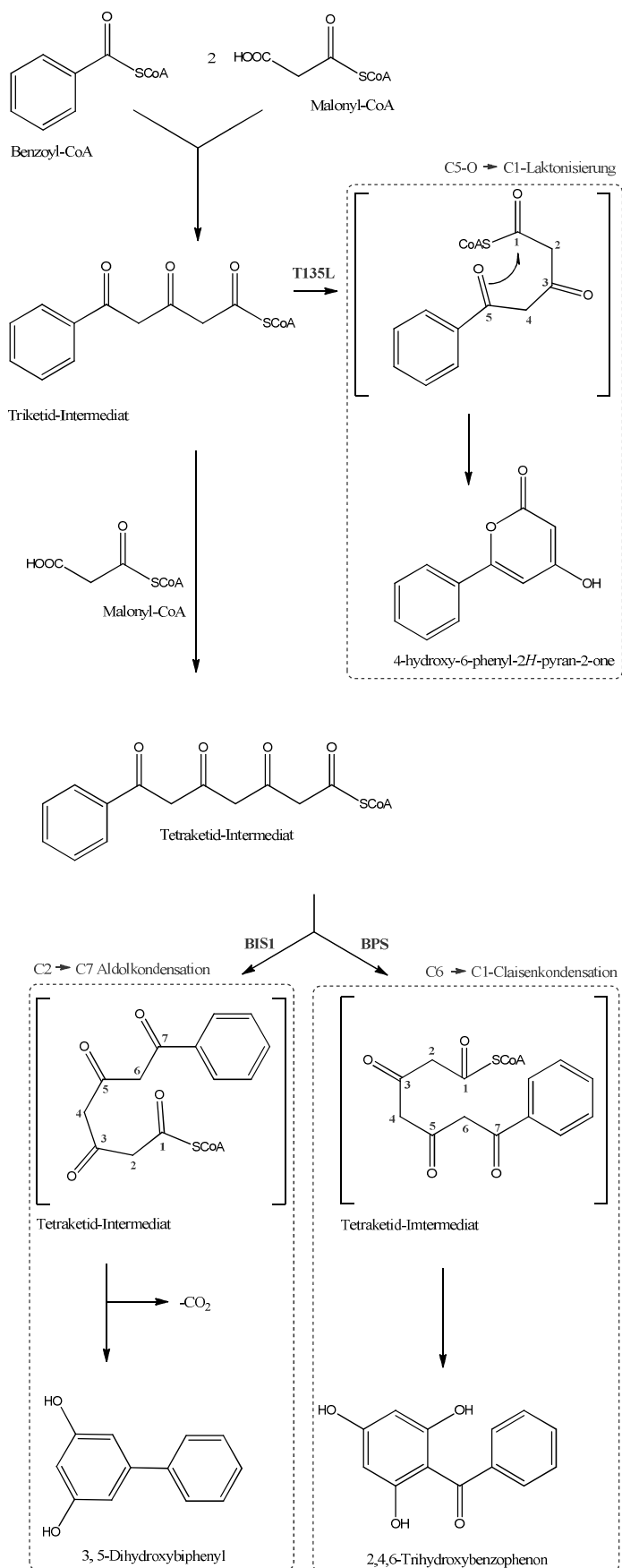
Die Enzyme, die dieser Arbeit zugrunde liegen, werden im Folgenden genauer beschrieben.

## 1.2 Superfamilie der Polyketidsynthasen

Die Superfamilie der Polyketidsynthasen (PKS) ist in drei Gruppen gegliedert. Allen gemeinsam ist der Aufbau von Poly- $\beta$ -Ketoverbindungen (Polyketiden) durch die Verknüpfung von  $C_2$ -Einheiten. Bei den Typ I und Typ II Polyketidsynthasen handelt es sich um multifunktionelle Enzymkomplexe, die pro Domäne einen Reaktionsschritt katalysieren. Die einzelnen Domänen der Polyketidsynthasen vom Typ I können wie im Fall der 6-Desoxyerythronolidsynthase B aus dem Bakterium *Saccharopolyspora erythraea* bis zu 350 kDa schwer sein (Donadio et al., 1992, Klingauf, 2005). Das Enzym baut das Grundgerüst des Makrolidantibiotikums Erythromycin A auf. Die Typ II Polyketidsynthasen sind im Gegensatz zu den Typ I PKS monofunktional und nicht dissoziierbar. Sie bestehen meist aus nur 4 Untereinheiten, dem Acylcarrierprotein, der Ketore-

duktase  $\alpha$  und  $\beta$  und einer Malonyl-CoA-Acyltransferase (Wendt-Pienkowski et al., 2005). Die Faltung und Cyclisierung der Produkte wird häufig von assoziierten Enzymen übernommen. Der Topoisomerase-Hemmstoff Doxorubicin und das Antibiotikum Oxytetracyclin sind die klinisch relevantesten Produkte, die von Typ II PKS synthetisiert werden.

Typ III Polyketidsynthasen sind Homodimere und mit einer Masse von 40-45kDa pro Untereinheit deutlich kleiner als die PKS vom Typ I und II. Jede Untereinheit besitzt ein aktives Zentrum, in dem nicht nur die Decarboxylierung und die Kondensation, sondern auch die Zyklisierung und, wenn es dazu kommt, auch die Aromatisierung stattfindet (Austin et al., 2003). Anhand der Kristallstruktur der CHS aus Luzerne konnte gezeigt werden, dass ein enger Tunnel als CoA-Bindedomäne in das aktive Zentrum führt, welches die Substrat/Polyketid-Bindetasche mit der katalytischen Triade und die Elongationstasche beinhaltet, in welcher die wachsende Polyketidkette Platz findet (Jez et al., 2000). Die Größe der Bindetasche und der Elongationstasche können variieren, aber die katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cys-His-Asn, ist in allen Typ III PKS hoch konserviert. Die am besten untersuchte Typ III PKS ist die Chalconsynthase (CHS) aus *Medicago sativa*, aus der sich viele weitere Typ III PKS entwickelt haben. Bei allen Polyketidsynthasen wird ein Startersubstrat, wie z.B. 4-Cumaroyl-CoA) bei der CHS mit einer oder mehreren Acetyl-Einheiten aus Malonyl-CoA zu einer Polyketidkette verknüpft. Aus dem Polyketid-Intermediat entstehen dann durch Cyclisierung und gegebenenfalls Aromatisierung die entsprechenden Produkte. Die Typ III PKS sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Die einzelnen PKS unterscheiden sich durch das bevorzugte Startersubstrat, die Anzahl der Verlängerungsschritte mit Acetyl-Einheiten und den Cyclisierungsmechanismus. Bisher sind drei unterschiedliche Cyclisierungsmechanismen bekannt (Abb. 3). Zum einen gibt es die C6→C1 Claisen-kondensation, die erstmals für die CHS aus *M. sativa* beschrieben wurde (Ferrer et al., 1999). Zum anderen kommt auch die C2→C7 Aldolkondensation vor, bei der das C1-Kohlenstoffatom der Polyketidkette durch Decarboxylierung abgespalten wird. Dieser Mechanismus wurde erstmals für die Stilbensynthase (STS) aus *Pinus sylvestris* publiziert (Austin et al., 2004). Eine heterocyclische Ringbildung ist die C5-O→C1 Laktonisierung, die z.B. bei der 2-Pyrone synthase (2PS) vorkommt (Jez et al., 2000).



**Abbildung 3:** Von Polyketidsynthasen katalysierte Cyclisierungsreaktionen. BIS, Biphenylsynthase; BPS Benzophenonsynthase; T135L Punktmutante der BPS

Als Startersubstrate kommen kleine Starter wie das Acetyl-CoA bei der 2-Pyronsynthese (Jez et al., 2000) oder auch sehr voluminöse Moleküle wie das N-Methylantraniloyl-CoA bei der Acridonsynthese aus *Ruta graveolens* (Lukacin et al., 1999) zum Einsatz. Ein seltener Starter ist das Benzoyl-CoA, welches von den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen BIS1 und BPS als bester Starter genutzt wird.

Die Anzahl der Verlängerungen mit Acetyl-Einheiten aus Malonyl-CoA kann ebenfalls stark variieren. Oktaketidsynthasen, wie sie in *Aloe arborescens* (Mizuuchi et al., 2009) und *Hypericum perforatum* (Karppinen et al., 2008) gefunden wurden, können mit unterschiedlichen Starten bis zu sieben Kondensationen durchführen. In nachfolgender Tabelle 1.1 sind einige Typ III PKS mit ihrem bevorzugten Startersubstrat, der Anzahl der verwendeten Malonyl-CoA Einheiten und ihrem Cyclisierungsmechanismus aufgelistet.

Tab.1.1 : Übersicht unterschiedlicher Typ III PKS mit Angabe der Startersubstrate, Verlängerungsreaktionen und Zyklisierungsmechanismen

Startersubstrat	Malonyl-CoA	Name des Enzyms	Cyclisierungsmechanismus
4-Cumaroyl-CoA	3	Chalconsynthase (CHS)	C6→C1 Claisenkondensation
4-Cumaroyl-CoA	3	Stilbensynthase (STS)	C2→C7 Aldolkondensation
Benzoyl-CoA	3	Biphenylsynthase (BIS)	C2→C7 Aldolkondensation
Benzoyl-CoA	3	Benzophenonsynthase (BPS)	C6→C1 Claisenkondensation
N-Methylantraniloyl-CoA	3	Acridonsynthase (ACS)	C6→C1 Claisenkondensation
Acetyl-CoA	2	2-Pyronsynthase (2 PS)	C5-O→C1 Laktonisierung
Isobutyryl-CoA	3	Isobutyrophenonsynthase (BUS)	C6→C1 Claisenkondensation
Isovaleryl-CoA	3	Valerophenonsynthase (VPS)	C6→C1 Claisenkondensation

### 1.3 Biphenylsynthase aus *Sorbus aucuparia*

Die in dieser Arbeit verwendete Biphenylsynthase (BIS1) wurde zuerst in Zellkulturen von *Sorbus aucuparia* (Eberesche oder Vogelbeere, Rosaceae) identifiziert, die mit Hefeextrakt versetzt wurden (Liu et al., 2004). Als Antwort auf die Behandlung mit Hefeextrakt akkumulierte das Biphenyl Aucuparin, welches von der Pflanze als Phytoalexin gebildet wird. Das Grundgerüst des Aucuparins, das 3,5-Dihydroxybiphenyl, wird von der BIS1 durch eine Kondensation von 3 Molekülen Malonyl-CoA und einem Molekül Benzoyl-CoA als Starter aufgebaut, indem das Tetraketid-Intermediat anschließend durch eine C2→C7-Aldolkondensation cyclisiert (Abb. 3). Dieser Mechanismus wurde

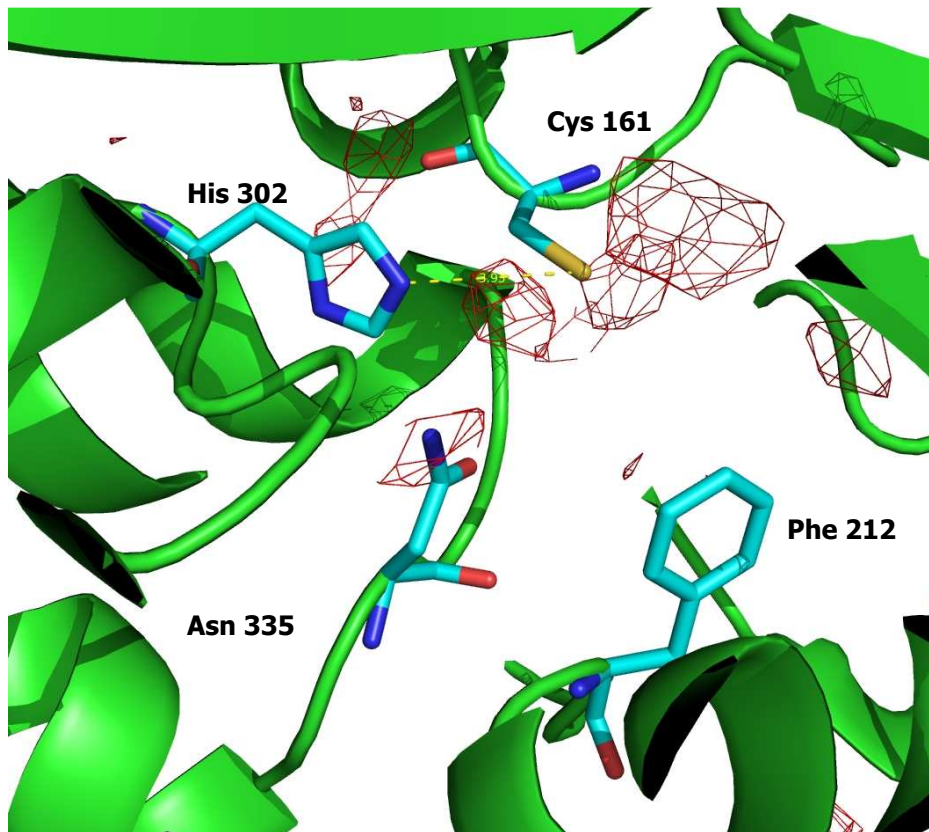
zum ersten Mal für die Stilbensynthase (STS) aus *Pinus sylvestris* beschrieben und durch die Kristallisation des Enzyms bewiesen (Austin et al., 2004). Da die Aminosäuren, die in der STS die von der CHS abweichende Zyklisierungsreaktion ermöglichen, in der BIS1 nicht vorkommen, besteht die Möglichkeit, dass noch ein alternativer Zyklisierungsmechanismus zur Kontrolle der Zyklisierung zu den Biphenylen existiert. Über eine Kristallisierung der BIS1 soll dieser Frage nachgegangen werden.

Die BIS1 wurde in unserem Labor kloniert und charakterisiert (Liu et al., 2007). In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten Parameter genannt. Es handelt sich um ein Homodimer mit einer Masse von 43kDa pro Untereinheit. Der offene Leserahmen (ORF) beträgt 1173bp und der isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 6,56. Das Temperaturoptimum ist 35°C und das pH-Optimum 6,5-7.

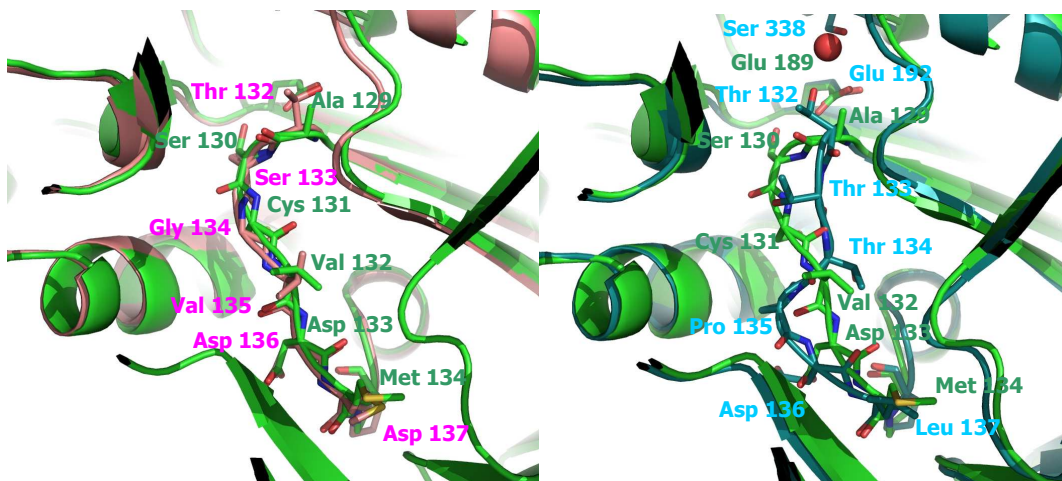
Tab.1.2 : Eigenschaften der BIS1

Parameter	BIS1 aus ( <i>S.aucuparia</i> )
ORF-Länge [bp]	1173
Untereinheiten-Größe [kDa]	43
Aminosäuren	390
Isoelektrischer Punkt (pI)	6.56
pH-Optimum	6.5 - 7
Temperaturoptimum [°C]	35
$K_m$ (Benzoyl-CoA) [ $\mu$ M]	0.7
$K_{cat}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0.43
$K_{cat}/K_m$ [ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ]	10181

Obwohl es Raeth (2007) bereits gelungen war die BIS1 zu kristallisieren, konnte die Kristallstruktur nicht eindeutig aufgeklärt werden, da Sauerstoff im aktiven Zentrum eingelagert war (Abb. 4, rot hervorgehobene Elektronenwolken des eingelagerten Sauerstoffs). In Abbildung 5 sind die bisher gewonnenen Kristallbilder der BIS1 denen der CHS aus *M. sativa* und der STS aus *P. sylvestris* gegenübergestellt (Raeth, 2007). Man kann deutlich erkennen, dass das Gerüst im Bereich der Aminosäuren 129 bis 134 von BIS1 und CHS fast deckungsgleich verläuft, während es bei der STS deutlich abweicht, obwohl das letzte Enzym die gleiche Cyclisierung wie die BIS1 katalysiert. Es wurde vermutet, dass sich die Struktur des Rückgrats durch Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem eingelagerten Sauerstoff verschoben hat (Raeth, 2007).



**Abbildung 4:** Überlagerung der BIS1-Raumstruktur im Bereich des aktiven Zentrums mit der Elektrodichtekarte. In Nachbarschaft zum katalytischen Cystein-161 liegen die rot dargestellten Elektronenwolken der eingelagerten Sauerstoffmoleküle (nach Raeth, 2007)



**Abbildung 5:** BIS1 aus *Sorbus aucuparia* im Vergleich mit der CHS aus *Medicago sativa* (links) und der STS aus *Pinus sylvestris* (rechts) (nach Raeth, 2007)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein reproduzierbares Aufreinigungsprotokoll für die BIS1 erstellt werden, um eine gleichbleibende Reinheit der Kristallisationslösung zu gewährleisten und eine Kristallisation von aufeinanderfolgenden Chargen bei gleichbleibenden Kristallisationsbedingungen zu ermöglichen. Die gebildeten Kristalle soll-

ten dann nach und nach mit Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA und dem Reaktionsprodukt 3,5-Dihydroxybiphenyl co-kristallisiert werden, da nur so eine korrekte Nachstellung der natürlichen Konformationsverhältnisse gewährleistet werden kann.

#### 1.4 Benzophenonsynthase aus *Hypericum androsaemum*

Während die erste Benzophenonsynthase-Aktivität in Zellkulturen von *Centaurium erythraea* (Tausendgüldenkraut, Gentianaceae) nachgewiesen wurde (Beerhues, 1996), wurde dieses Enzym im Laufe der Zeit auch in anderen Pflanzen entdeckt, wie zum Beispiel die in dieser Arbeit verwendete Benzophenonsynthase aus *Hypericum androsaemum* (Hypericaceae) (Liu et al., 2003). In *Centaurium erythraea* ist das bevorzugte Startersubstrat 3-Hydroxybenzoyl-CoA, während die BPS aus *Hypericum androsaemum* Benzoyl-CoA als Starter bevorzugt. Da es sich bei Benzoyl-CoA, wie zuvor erwähnt, um einen seltenen Starter handelt, war bereits die Frage nach der Herkunft der unterschiedlichen Startersubstrate interessant. Es konnte gezeigt werden, dass das Benzoyl-CoA in *H. androsaemum* aus dem Abbau der Seitenkette von Cinnamoyl-CoA hervorgeht (Abd El-Mawla and Beerhues, 2002), während 3-Hydroxybenzoyl-CoA in *C. erythraea* direkt aus dem Shikimatweg stammt (Abd El-Mawla et al., 2001).

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Mutationsexperimente haben ihren Ursprung in der gemeinsamen Entdeckung von Benzophenonsynthase (BPS) und Chalconsynthase (CHS) in *H. androsaemum*. Die CHS bevorzugt 4-Cumaroyl-CoA als Starter, kann jedoch auch Benzoyl-CoA umsetzen (22% der Aktivität mit 4-Cumaroyl-CoA), während die BPS mit 4-Cumaroyl-CoA inaktiv ist. Durch Mutation von drei Aminosäuren im aktiven Zentrum der CHS zu den entsprechenden Aminosäuren der BPS (Leu 263 Met, Phe 265 Tyr und Ser 338 Gly) gelang es, die Substratspezifität der CHS zu verändern. Die BPS-Aktivität nahm durch die Mutation um 50% zu, wohingegen die Aktivität mit 4-Cumaroyl-CoA etwa sechsfach reduziert wurde (Liu et al., 2003). Auf Basis dieses Erfolges wurden weitere Mutationen im aktiven Zentrum der BPS durchgeführt, wovon die T135L Mutante im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden soll.

Auch die Benzophenonsynthase gehört zu den Typ III Polyketidsynthasen und besteht ebenfalls aus zwei homologen Untereinheiten (Homodimer), wobei jede Untereinheit eine molare Masse von 42,8 kDa aufweist. Weitere charakteristische Eckdaten sind in Tabelle 1.3 analog zur BIS1 aufgeführt.

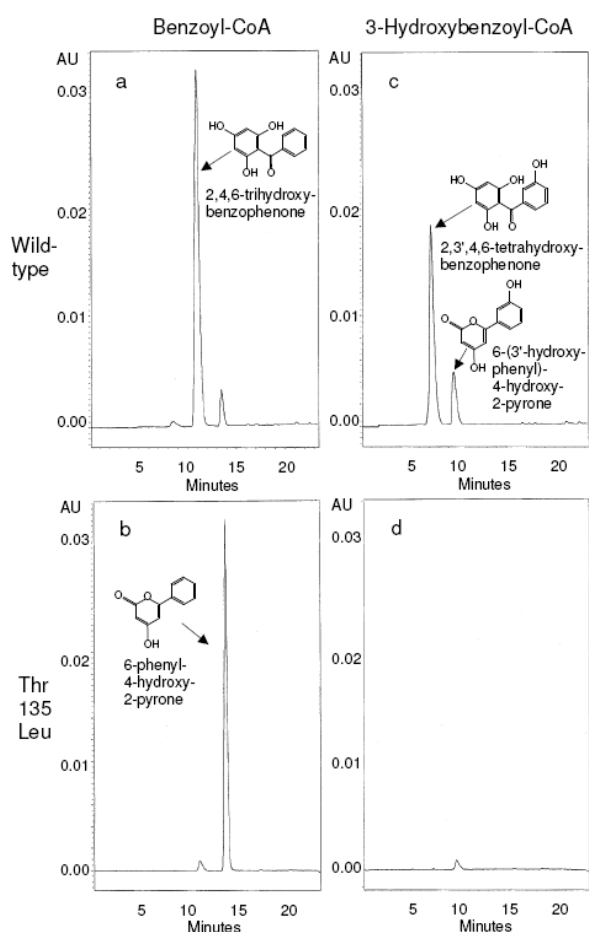


Tab.1.3 : Parameter der BPS aus *Hypericum androsaemum*

Parameter	BPS aus ( <i>H. androsaemum</i> )
ORF-Länge [bp]	1188
Untereinheiten-Größe [bp]	42.7
Aminosäuren	395
Isoelektrischer Punkt (pI)	5.78
pH-Optimum	6.5 - 7
Temperaturoptimum [°C]	35
$K_m$ (Benzoyl-CoA) [ $\mu$ M]	5.7
$K_{cat}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	9.66
$K_{cat}/K_m$ [ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ]	28345

Im Gegensatz zur BIS1 wurden für die BPS diverse Mutationsversuche durchgeführt, um die Struktur anhand dieser Daten und eines Computer-Modelling zu beweisen. Durch Punktmutationen wurde zunächst versucht die BPS in Richtung CHS zu verändern. Weder Einzel-, Doppel- oder Mehrfachmutanten zeigten einen relevanten Unterschied in der Substrat- und Produktspezifität im Vergleich zum BPS Wildtyp (Klundt 2008). Danach wurden die Aminosäuren des aktiven Zentrums nach und nach durch mehr oder weniger sperrige Aminosäuren ausgetauscht. Mit der Mutante BPS T135L wurde ein Enzym gefunden, das sowohl eine Substrat- als auch eine Produktänderung gegenüber dem Wildtyp zeigte (Klundt et al., 2009). Diese BPS Mutante bevorzugt ebenfalls Benzoyl-CoA, aber es kommt nur zu einer zweifachen Kettenverlängerung durch Malonyl-CoA. Damit wird von der Mutante lediglich 6-Phenyl-4hydroxy-2-pyrone gebildet, welches bei der Inkubation des Wildtyps als geringes Nebenprodukt entsteht. Vom ehemaligen Hauptprodukt sind nur Spuren detektierbar. Bei einer Inkubation mit dem zweitbesten Starter des Wildtyps, 3-Hydroxybenzoyl-CoA, konnten bei der Mutante nur noch Spuren des Nebenproduktes gefunden werden, während das Hauptprodukt gar nicht mehr gebildet wurde (Klundt et al., 2009) (Abb. 6).

Figure 3



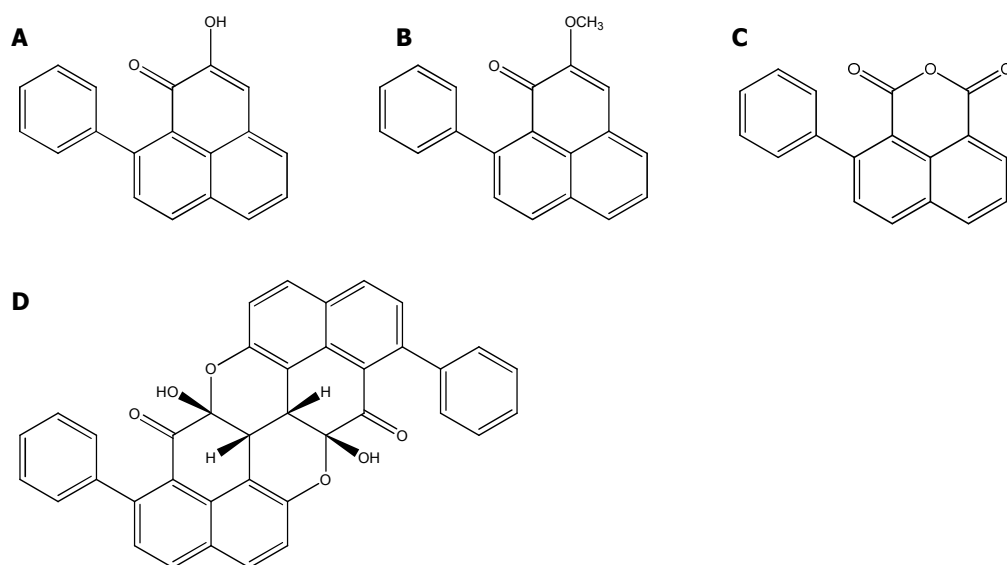
**Abbildung 6:** HPLC-Analyse der BPS-Wildtyp-Produkte (a,c) und der T135L Mutante (b,d) mit Benzoyl-CoA (a,b) und 3-Hydroxybenzoyl-CoA (c,d) als Startersubstrate

Es wurde aufgrund der Homologie-Modellierung die Hypothese aufgestellt, dass durch das ausgetauschte Threonin nicht nur die Elongationstasche der BPS-Mutante verschlossen wurde, sondern sich ebenfalls in der neu geformten Tasche Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, die das 3-Hydroxybenzoyl-CoA in der Tasche fixieren. Diese Hypothese sollte in dieser Arbeit durch Inhibitionsversuche bewiesen werden.

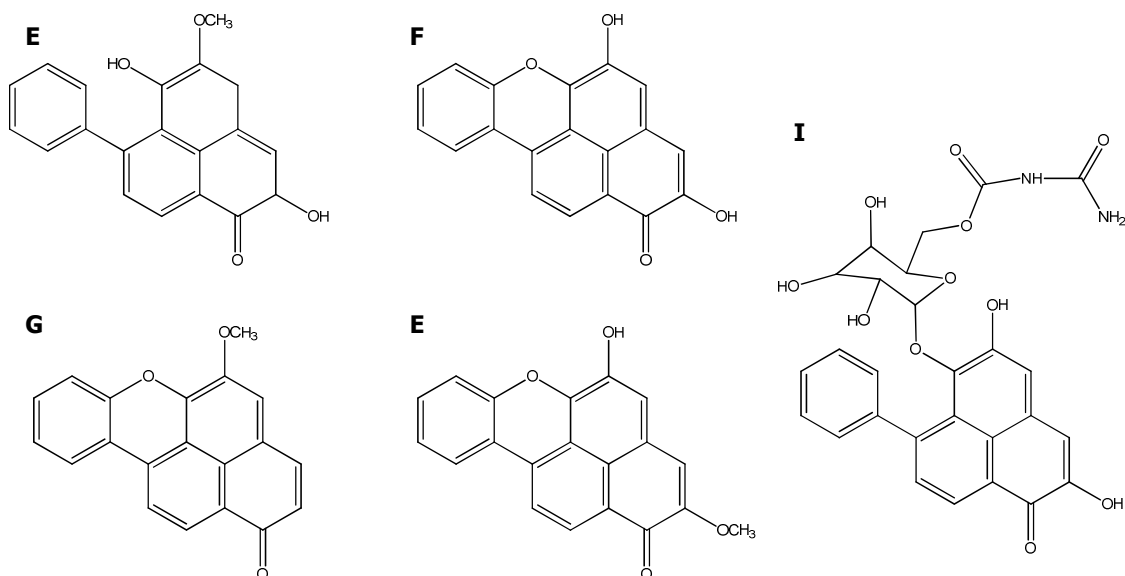
### 1.5 Phenylphenalenone und ihre Synthese in *Wachendorfia thyrsiflora*

In Kooperation mit der Gruppe von PD. Dr. Bernd Schneider (Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena) sollte anhand der beiden Typ III Polyketidsynthasen WtPKS1 und WtPKS2 aus der Versuchspflanze *Wachendorfia thyrsiflora* (Haemodraceae) die Biosynthese der Diarylheptanoide untersucht werden. Letztere dienen als Vorstufen der Phenylphenalenone. Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* wurden als Ver-

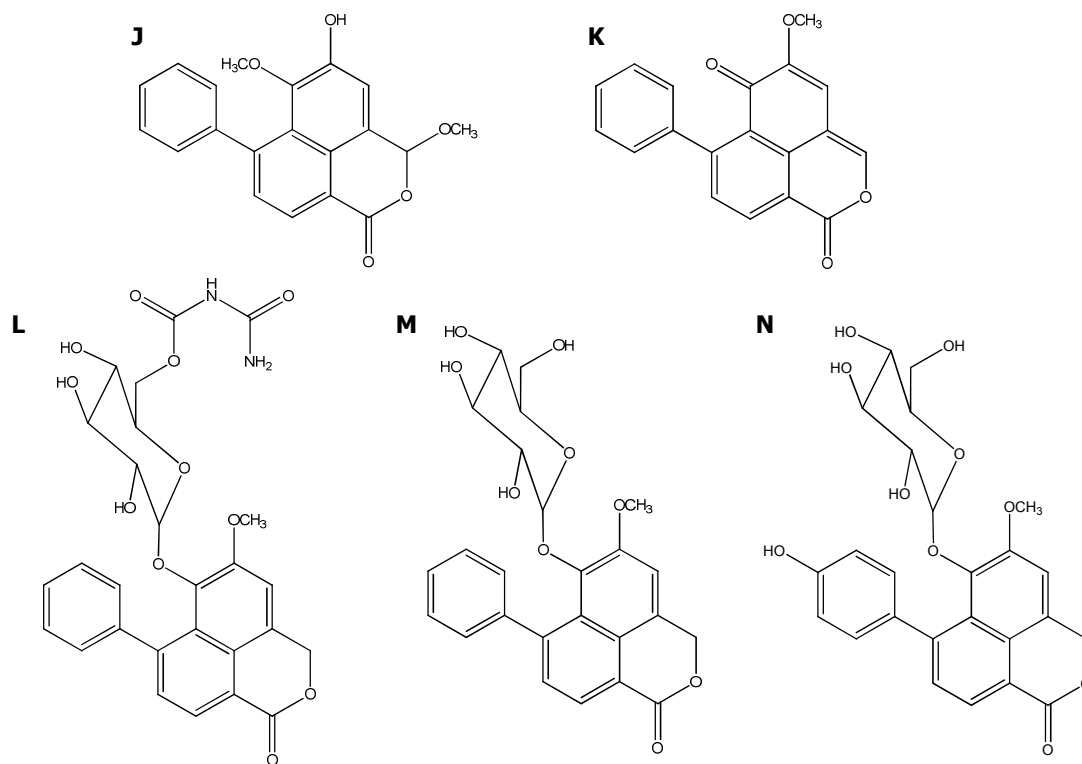
suchssystem ausgewählt, weil in ihnen konstitutiv Phenylphenalenone nachgewiesen wurden (Brand, 2005) (Abbildungen 7-9).



**Abbildung 7:** Phenylphenalenone ohne Sauerstoff in 5- und 6- Position **A**, Anigorufon; **B**, Methoxyanigorufon; **C**, 4-Phenyl-benzo[de]isochromen-1,3-dion; **D**, Anigorootin

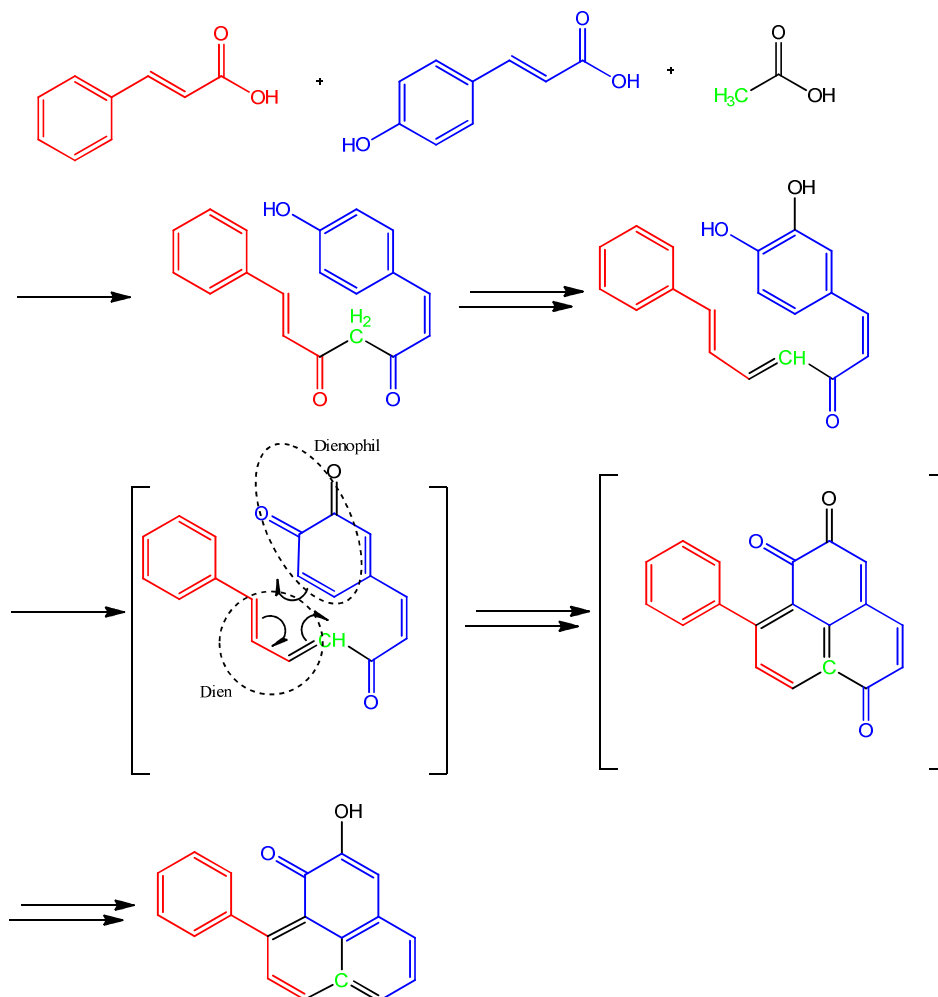


**Abbildung 8:** Phenylphenalenone mit Sauerstoff in 5- und /oder 6-Position **E**, Haemodrin; **F**, 5-Hydroxy-2-methoxy-6-oxa-benzo[def]chrysen-1-on; **G**, 5-Methoxy-6-oxa-benzo[def]chrysen-1-on; **H**, 2,5-Dihydroxy-6-oxa-benzo[def]chrysen-1-on; **I**, 6-O[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenyl-phenylen-1-on



**Abbildung 9:** Phenylphenalenone mit Sauerstoff im Ring (Phenylisochromenone) **J**, 5-Hydroxy-3,6-dimethoxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on; **K**, 5-Methoxy-7-phenyl-benzo[de]isochromen-1-on; **L**, 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-5-methoxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on; **M**, 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-(p-hydroxy-phenyl)-3H-benzo[de]isochromen-1-on; **N**, 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on

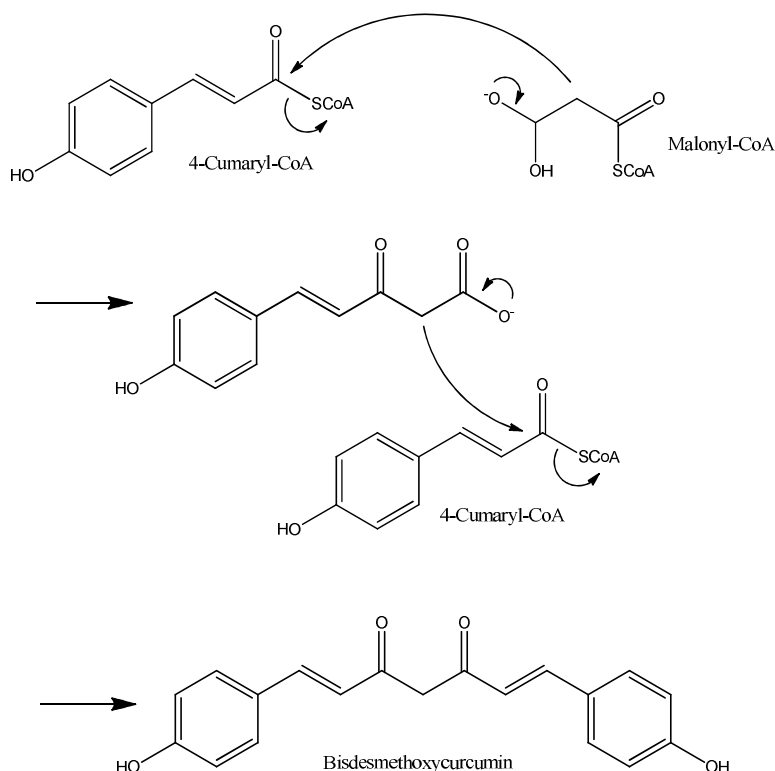
Anhand von Fütterungsexperimenten in *Anigozanthos preisii* konnte gezeigt werden, dass die komplexen Phenylphenalenone aus zwei Phenylpropanoid-Molekülen und einer Acetat-Einheit über ein lineares Diarylheptanoid als Zwischenstufe aufgebaut werden (Luque-Ortega et al., 2004; Marty et al., 2002). Dieser Mechanismus wird auch für die Synthese in *W. thyrsoflora* vermutet (Abb. 10). Die Zyklisierung verläuft dabei durch ein Dien und ein Dienophil - vorliegend in einer Konformation, die eine Diels-Alder-Kondensation (4+2 Cycloaddition) erlaubt - offenbar so schnell, dass die Diarylheptanoidkonzentration in *W. thyrsoflora* in vivo unter der Nachweisgrenze bleibt (Brand, 2005). Moderne biochemische Verfahren erlauben es, die Enzyme zu isolieren und die von ihnen katalysierten Reaktionen einzeln zu betrachten, wodurch es möglich ist, die Einzelreaktionen genauer zu untersuchen.



**Abbildung 10:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Phenylphenalenon-Synthese (nach Brand, 2005)

Obwohl es sich bei der Versuchspflanze *W. thyrsiflora* um eine wirtschaftlich unbedeutende Pflanze handelt, ist die Erforschung der Biosynthesen der Phenylphenalenone und auch der Diarylheptanoide von großem Interesse. Phenylphenalenone kommen beispielsweise auch in Bananen (Musaceae) vor (Luis et al., 1995), die in vielen Entwicklungsländern als Grundnahrungsmittel dienen. Während bei wild wachsenden Arten eine deutliche Induzierbarkeit der Phenylphenalenone nach Infektion nachweisbar war (Luis et al. 1995; Binks et al., 1997), leiden die kultivierten Arten häufig an Pilzbefall, was zu drastischen Ernteverlusten führen kann (Craenen et al., 1998). Durch die Erforschung der Biosynthese der Phenylphenalenone erhofft man sich, resistente Sorten züchten zu können, damit weniger Pflanzenschutzmittel zum Einsatz kommen. Neben der Phytoalexin-Funktion sind bisher nur wenige Wirkungen beschrieben. Es gibt Hinweise auf antitumorale sowie antibakterielle und fungitoxische Wirkungen verschiedener Phenylphenalenone. Für Anigorufon, welches auch in *W. thyrsiflora* detektiert werden konnte, wurde kürzlich eine antileishmanielle Wirkung festgestellt (Luque-Ortega et al., 2004; Marty et al., 2002).

Auch unter den Diarylheptanoiden finden sich interessante Naturstoffe. Zu diesen im Pflanzenreich weit verbreiteten Sekundärstoffen gehört auch das Curcumin, welches dem Curry seine gelbe Farbe verleiht. Es wird seit langem in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt. Heutzutage wird es aufgrund seiner antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkung als Nahrungsergänzungsmittel beworben. Im Mittelpunkt des Interesses steht allerdings die antiproliferative Wirkung und damit der Einsatz bei verschiedenen Krebsarten (Dorai et al., 2000; Jiang et al., 1996; Bielak-Zmijewska et al., 2000). Die Biosynthese des Curcumins und seiner Derivate wird zur Zeit in mehreren Pflanzen untersucht und ist auch Gegenstand dieser Arbeit. Die Abbildung 11 zeigt den allgemeinen Biosyntheseweg der Diarylheptanoide am Beispiel von 4-Cumaroyl-CoA als Starter und Malonyl-CoA als Kettenverlängerer.



**Abbildung 11:** Biosynthese des Bidesmethoxycurcumins (Morita et al., 2007; Katsuyama et al., 2009)

In Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* wurden die mRNA von drei Polyketidsynthasen gefunden, welche als WtPKS1, WtPKS2 und WtPKS3 bezeichnet wurden (Brand, 2005). Weitere Polyketidsynthase-cDNAs wurden in dieser Pflanze jedoch bisher nicht entdeckt. Es wurde daher vermutet, dass die in der Pflanze vorkommenden Phenylphenolenone unter Beteiligung von wenigstens einer dieser drei Polyketidsynthasen gebildet werden. Brand (2005) konnte zeigen, dass die WtPKS1 die Kondensation von einem CoA-Ester als Starter mit einem oder zwei Molekülen Malonyl-CoA als Verlängerer katalysiert, wobei die Produkte 4-(4-Hydroxyphenyl)-but-3-en-2-on nach einer Kondensation mit Malonyl-CoA und 4-Hydroxy-6-(4-hydroxystyryl)-2H-pyran-2-on nach Verlängerung mit zwei Molekülen Malonyl-CoA gebildet wurden (Abb. 12). Das Enzym WtPKS1 bevorzugt 4-Cumaryl-CoA als Starter gegenüber Cinnamoyl-CoA (Brand et al., 2005). Die Aufklärung des nächsten Reaktionsschrittes ist Gegenstand dieser Arbeit.

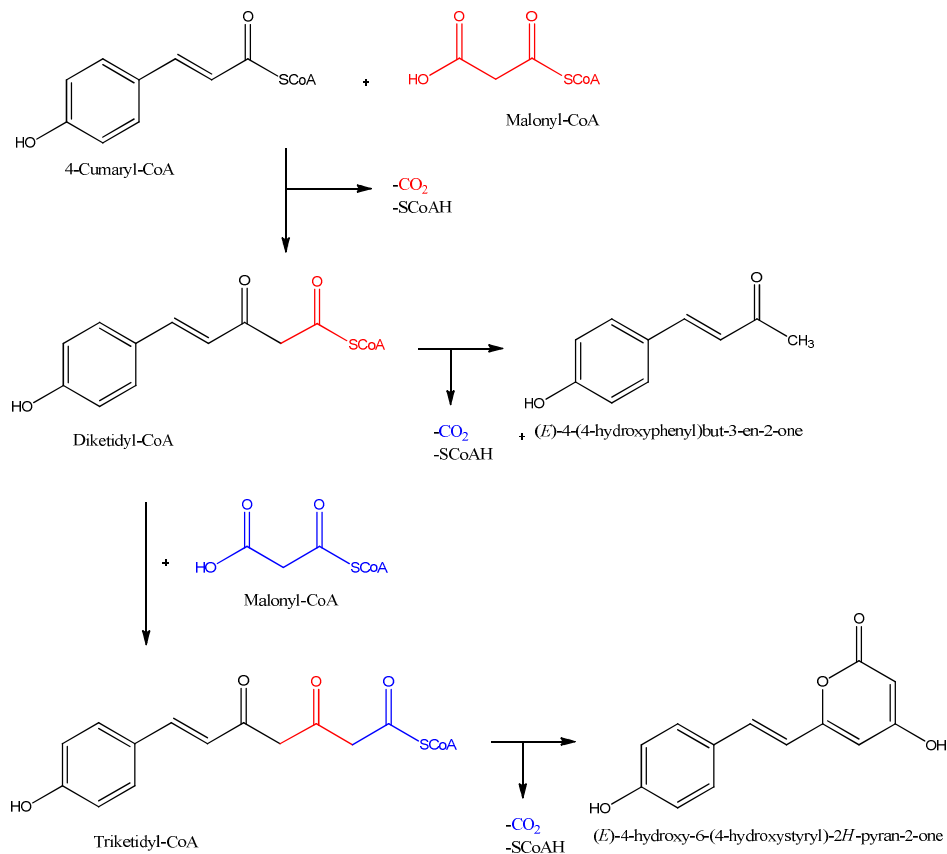


Abbildung 12: Reaktion von WtPKS1 mit 4-Cumaryl-CoA als Starter

## 1.6 Zielsetzungen

- Erstellen eines Aufreinigungsprotokolls für die Proteinkristallisation
- Kristallisierung der Biphenylsynthase (BIS1) aus *Sorbus aucuparia*
- Kristallisierung der Benzophenonsynthase (BPS) aus *Hypericum androsaemum*
- Co-Kristallisierung mit den CoA-Estern und dem enzymatischen Produkt der BIS1 (3,5-Dihydroxybiphenyl)
- Co-Kristallisierung mit den CoA-Estern und dem enzymatischen Produkt der BPS (2,4,6-Trihydroxybenzophenon)
- Strukturaufklärung durch das Institut für Physikalische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg, AG Prof. Dr. Milton Stubbs
- Kristallisierung der Benzophenonsynthase (BPS) aus *Hypericum androsaemum*
- Beweisführung für den inhibitorischen Effekt des 3-Hydroxybenzoyl-gestarteten Triketids auf die BPS Mutante T135L
- Erforschung der Diarylheptanoidsynthese anhand klonierter Enzyme



## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

#### 2.1.1 Chemikalien

##### *Biochemische Reagenzien*

Substanz	Bezugsquelle
Benzoyl-CoA Lithiumsalz	Sigma Aldrich
Malonyl-CoA Lithiumsalz	Sigma Aldrich
Acetyl-CoA Lithiumsalz	Sigma Aldrich
IPTG	Sigma Aldrich
Kanamycinsulfat	Fluka
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Chloramphenicol	Fluka
Tris ultra pure	Roth
SDS	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
Natriumcarbonat, wasserfrei	Roth
Imidazol	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Essigsäure	Roth
o-Phosphorsäure	Roth
Ethanol absolut	Sigma Aldrich
Methanol	Fischer-Scientific
Ethylacetat	Fischer-Scientific
Chloroform	Fischer-Scientific
Naringenin	Sigma Aldrich
Coomassie brilliant blue R250	Life Technologies
Pepton aus Casein	Roth
Hefeextrakt	Roth
Agar-Agar	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Bio-Rad
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Isopropanol	
Natriumhydroxid	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Salzsäure, 37%	Riedel-de-Haen
2,4,6-Trihydroxybenzophenon	ICN Biomedicals Inc.
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab
dNTP's	Fermentas
Ethidiumbromid	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
TEMED	Bio-Rad
Amoniumperoxodisulfat	Roth

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien hatten p.a. oder HPLC-Qualität.

**Substanzen für die Inkubation und Referenzen für die HPLC hergestellt in Jena**

Substanz	Bezugsquelle
Bisdesmethoxycurcumin	Hergestellt von Dr. Bernd Schneider, Jena
5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on	
5-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-1,4,6-trien-3-on	
Diketidyl-dihydrozimtsäure-NAC-Ester	
Diketidylcumarsäure-NAC-Ester	
Diketidylzimtsäure-NAC-Ester	

**2.1.2 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie**

**Medien zur Kultivierung von *E. coli***

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
LB-Medium	Pepton 10,0g Hefe-Extrakt 5,0g NaCl 10,0g Reinstwasser ad 1000ml	Auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren
SOC-Medium	Pepton 5,0g Hefe-Extrakt 0,5g 1M NaCl 1,0ml 1M KCl 0,25ml Reinstwasser 97ml  <u>anschließend hinzufügen:</u> 2M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung 1ml 2M Glucose-Lösung 1ml Reinstwasser ad 100ml	Autoklavieren und Abkühlen lassen      Aliquotieren und bei -20°C lagern
2M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 20,33g MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 24,65g Reinstwasser ad 100ml	Sterilfiltrieren

Für die Herstellung der Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt.

**Puffer und Lösungen für die Plasmidisolierung**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Puffer P1	Tris-HCl 50mM EDTA 10mM RNase A 100µg/ml	Tris- und EDTA-Lösung werden sterilfiltriert und gemischt, pH 8,0 einstellen, RNase A wird frisch zugegeben
Puffer P2	NaOH 0,2M SDS 1%(w/v)	Autoklavieren
Puffer P3	Kaliumacetat 2,55M	pH 4,8 einstellen und autoklavieren

**Lösung für die Induktion**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
0,5 M IPTG-Lösung	ITPG 6,0g	Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

**2.1.3 Lösungen und Puffer für biochemische Untersuchungen****Agarosen für die Affinitätschromatographie**

Name	Firma
Ni-NTA-Agarose	Quiagen
Streptavidin-Agarose	Novagen

**Puffer zur Enzyminkubation**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7-7,5	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,36g	pH-Wert mit KOH einstellen, bei 4°C lagern
	Reinstwasser ad 100ml	

**Lösungen zur Enzyminkubation**

CoA Ester		Bemerkungen
Malonyl-CoA	2 bzw 4mg/ml	Für Standardinkubationen vor Gebrauch 1:10 verdünnt
Benzoyl-CoA	2mg/ml	
p-Coumaryl-CoA	2mg/ml	
Cinnamoyl-CoA	2mg/ml	

**Puffer zur Extraktion und Enzymreinigung mittels Ni-NTA Agarose**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Waschpuffer	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50mM	mit frischer NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen, bei 4°C lagern
	NaCl 300mM	
	Imidazol 80mM	
	Reinstwasser 100ml	
Lysispuffer	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50mM	mit frischer NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen, bei 4°C lagern
	NaCl 300mM	
	Imidazol 10mM	
	Reinstwasser 250ml	
Elutionspuffer	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50mM	mit frischer NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen, bei 4°C lagern
	NaCl 300mM	
	Imidazol 250mM	
	Reinstwasser 100ml	

### *Lösung zur Bestimmung des Proteingehaltes*

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Bradford-Lösung	Coomassie brilliant blue G-250 100mg	Coomassie in Ethanol lösen, Phosphorsäure zugeben und mit Wasser auf 1,0 Liter auffüllen, nach Filtration bei 4°C lagern
	Ethanol 96% 50ml	
	o-Phosphorsäure 100ml	
	Reinstwasser ad 1000ml	

### *Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese*

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Sammelgel (5% )	Reinstwasser 3,4ml	
	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 0,63ml	
	Acrylamid/Bis 30% 0,83ml	
	10% (w/v) SDS 0,05ml	
	10% (w/v) APS 0,05ml	
	TEMED 5µl	
Trenngel (12%)	Reinstwasser 3,3ml	
	1,5M Tris-HCl, pH 8,8 2,5ml	
	Acrylamid/Bis 30% 4,0ml	
	10% (w/v) SDS 0,1ml	
	10% (w/v) APS 0,1ml	
	TEMED 4µl	
Probenpuffer	Reinstwasser 2,7ml	bei 4°C lagern
	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 1,0ml	
	Glycerin 2,0ml	
	10% (w/v) SDS 3,3ml	
	β-Mercaptoethanol 0,5ml	
	0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,5ml	
10x Laufpuffer	Tris 15g	bei 4°C lagern, vor Gebrauch 1:10 verdünnen
	Glycin 72g	
	Na-SDS 5g	
	Reinstwasser ad 500ml	
Färbelösung	Coomassie blue R-250 Stammlösung 25ml	
	Methanol 100ml	
	Essigsäure 20ml	
	Reinstwasser ad 200ml	
Coomassie blue R-250 Stammlösung	Coomassie blue R-250 0,5g	Farbstoff in Wasser lösen und anschließend filtrieren
	Reinstwasser ad 50,0ml	
Entfärber	Methanol 30ml	
	Essigsäure 20ml	
	Reinstwasser ad 200ml	

***Puffer und Lösungen für native Proteingele***

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Sammelgel	Reinstwasser 3,2ml	
	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 1,25ml	
	Acrylamid/Bis 30% 0,5ml	
	10% (w/v) APS 0,05ml	
	TEMED 5µl	
Trenngel (7%)	Reinstwasser 5,64ml	
	1,5M Tris-HCl, pH 6,8 2,8ml	
	Acrylamid/Bis 30% 2,6ml	
	10% (w/v) APS 0,04ml	
	TEMED 9µl	
Trenngel (12%)	Reinstwasser 3,72ml	
	1,5M Tris-HCl, pH 8,8 2,8ml	
	Acrylamid/Bis 30% 4,52ml	
	10% (w/v) APS 0,04ml	
	TEMED 9µl	
Probenpuffer (nativ)	Reinstwasser 2,7ml	bei 4°C lagern
	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 2,13ml	
	Glycerin 5ml	
	0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,2ml	
10x Laufpuffer (nativ)	Tris 6.06g	pH-Wert auf 8.9 einstellen und bei 4°C lagern
	Glycin 28.53g	
	Reinstwasser ad 500ml	

***Lösung für die DNA-Gelelektrophorese***

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
50x TAE Puffer	Tris 2M	mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
	EDTA 0,05M	

***Puffer zur Gelfiltration und für die Kristallisation***

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
10mM Tris-Puffer	Tris 121mg	mit HCl auf pH 7,75 einstellen, sterilfiltrieren
	Reinstwasser ad 100ml	

### 2.1.4 Lösungen und Puffer für die Kristallisierung

Für die Kristallisierung wurden die folgenden Kristallisations-Kits verwendet:

Name des Kits	Firma
JBScreen classic 1-10	Jena Bioscience
JBScreen JCSG ++ 1-4	
Sigma basic	Sigma
Sigma cryo	
Sigma low ionic	
Sigma membrane proteins	
Sigma extenstion	
House factorials	Inst. Für Physikal. Biochemie Halle
Molecular Dimensions Morpheus	Molecular Dimensions

Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Puffer befindet sich in den Kristallisationspuffer-Tabellen im Anhang (7).

### 2.1.5 Antibiotika

#### *Antibiotika*

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Ampicillin	Ampicillin 100,0mg H <sub>2</sub> O bidest. ad 1,0ml	Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern
Chloramphenicol	Chloramphenicol 30,0mg Ethanol 100% 1,0ml	bei -20°C lagern
Kanamycin	Kanamycin 30,0mg H <sub>2</sub> O bidest. ad 1,0ml	Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

### 2.1.6 Enzyme

#### *Enzyme*

Verwendung	Name	Hersteller
Restriktion	EcoR 1	Fermentas
	KpN 1	Fermentas
	Nhe 1	Fermentas
	BamH 1	Fermentas
Enzyme zur His-tag Abspaltung	Thrombin Restriction grade	Novagen
	Biotinyliertes Thrombin	Novagen
	TEV-Protease	Uni Halle
Weitere Enzyme	T <sub>4</sub> Ligase	Fermentas
	RNAse A	Fermentas
	Taq-Polymerase	Fermentas

## 2.1.7 Bakterienstämme und Plasmide

### Bakterienstämme

E.coli	Relevante Eigenschaften
K12 DH5 $\alpha$	<i>F' <math>\phi</math>80<math>\delta</math>lacZAM15 end A1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 thi-1 <math>\lambda</math>-gyrA96 relA1 <math>\Delta</math>(lacZYA-argFV196) deoR</i>
BL 21(DE3) pLys S	<i>F' ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)</i>

### Vektoren

Plasmid	Bezugsquelle
pR SET B	Invitrogen
pET 28 c	Novagen

## 2.1.8 Primer

Name	Sequenz
5SaBIS TEV	AAAAAGCTAGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCCAA AATCCTAGCCATTGGC
3ExpBPSHC	GCATGGTACCTCACTGGAGGATGGGGA
5SaBIS1Nhe1TEV	AGTCGCTAGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCATGGCG CCTTTGGTTAAGAATCA
5HaBPS TEV	AAAAAGCTAGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCTAGT GTCCTCGCTATTGGA
HaBPSEcoR1	GATGAATTCTCACTGGAGAATTGGGACACTCTG

## 2.2 Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Waagen	Analysenwaage	Satorius
	Feinwaage	Satorius
Wasserbad	Extratherm U3	Julabo
Heizblock	Dri Block DB 3D	Techne
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech
Zentrifugen	1-15K	Sigma
	GS-6R Centrifuge	Beckmann
	Biofuge pico	Heraeus
	Universal 32R	Hettig
Vortexer	VF 2	Janke & Kunkel
Thermocycler	T personal	Biometra
Spannungsgeber	Power PAC 300	Bio Rad
	Standard Power Pack P25	Biometra
Autoklav	Systec VX-120	Systec GmbH
HPLC	1200 Series	Agilent Technologies
	Degasser JP 60800795	Agilent Technologies
	Bin Pump DE 63055983	Agilent Technologies
	ALS DE 630557607	Agilent Technologies
	TCC DE 63058109	Agilent Technologies
	DAD DE 63056465	Agilent Technologies
FPLC	Bio Logic workstation	Bio Rad
	Fraktion collector 2128	Bio Rad
Zentrifugenkonzentratoren	Vivaspin 6	Vivascience
	Vivaspin 20	Vivascience
Reinluft	LaminAir HLB 2472	Heraeus
Reinstwasser	Arium 611	Satorius
pH-Meter	Digital pH meter 325	WTW (wissenschaftlich technische Werkstätten)
Vakuumkonzentrator	RVC 2-18	Christ
Geldokumentation	MultiImage Light Cabinett	Alpha Innotech Corporation



### 3 Methoden

#### 3.1 Methoden der Molekularbiologie

##### 3.1.1 Anzucht und Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte in der Regel in LB-Medium (2.1.2), dem die entsprechenden Antibiotika (2.1.5.) zugesetzt wurden. Für die Anzucht bei der Transformation wurde allerdings zunächst SOC-Medium (2.1.2) verwendet und die angezogenen *E.coli* im Anschluss auf LB-Platten mit Selektionsagar ausgestrichen. So konnten in einer Übernachtinkubation im Brutschrank bei 37°C Einzelkolonien gewonnen werden.

Für die Plasmidextraktion wurden die Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Rundschüttler angezogen.

Um die *E. coli* in ausreichender Menge für die Proteinexpression zu erhalten, wurden die Einzelkulturen zunächst in 10 ml LB-Medium überführt. Nach 12-14 Stunden wurden 100 ml LB-Medium mit 4 ml der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 vermehrt. Da dieser Maßstab für die Expression der Proteine, die für die Kri-satllisation exprimiert werden sollten, nicht ausreichte, wurden die Bakterien in diesem Fall in 50 ml LB-Medium angezogen. Nach 14 Stunden wurden 15 ml dieser Kultur in 400 ml LB-Medium überführt. Dies geschah in Schikanekolben, die eine bessere Durchlüftung des Mediums und somit ein besseres Wachstum der *E. coli*-Zellen gewährleisten. Nach 1,5 bis 3 Stunden war eine OD<sub>600</sub> von 1,0 erreicht und die Kultur konnte weiterverwendet werden.

##### 3.1.2 Lagerung von *E. coli*-Kulturen

Für die verwendeten *E. coli*-Stämme (2.1.7) wurden Dauerkulturen angelegt, da diese bei -80°C langfristig gelagert werden können. Dazu wurde ein Aliquot aus einer Übernachtskultur in der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und mit der gleichen Menge autoklaviertem Glycerol (87%) gemischt.

Für die kurzfristige Lagerung (max. 4 Wochen) wurden die Dauerkulturen auf LB-Platten ausgestrichen, die zur Selektion zuvor mit den entsprechenden Antibiotika behandelt wurden.

### 3.1.3 Keimzahlbestimmung

Eine photometrische Abschätzung der Bakteriendichte wurde mit Hilfe der Trübungsmessung vorgenommen (Bertram und Gassen, 1991). Bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde 1 ml beimpftes LB-Medium vermessen und die Lichtstreuung, die durch die Keime hervorgerufen wurde, als scheinbare Extinktion gegen steriles Medium bestimmt. Eine Absorption von  $OD_{600} = 1,0$  entspricht bei *E. coli* einer ungefähren Zellzahl von  $8 \times 10^8$ .

### 3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Bei der Minipräparation wird Plasmid-DNA aus *E. coli* isoliert. Dabei wird die Zellwand der Bakterien zunächst durch die Zugabe von EDTA geschwächt, da es an die zweiwertigen Metallionen in der Lipiddoppelschicht bindet. Danach werden die Zellen einer alkalischen Lyse unterworfen, wobei das EDTA die Degeneration verhindert, da es Magnesium-Ionen bindet, welche ein Kofaktor für bakterielle Nukleasen sind. Bei der Lyse mit NaOH wird sowohl die chromosomale- als auch die Plasmid-DNA in Einzelstränge denaturiert, während die zirkulären DNA-Stränge des Plasmids verknäueln bleiben. Wird der pH-Wert neutralisiert, renaturieren die DNA-Stränge, wobei die langen chromosomalen Stränge zu einem Knäuel hybridisieren. Das ebenfalls zugegebene SDS löst während der alkalischen Lyse die Lipide der Zellmembran und zelluläre Proteine (Birnboim und Dolly, 1979). Wenn dann zur Neutralisation Kaliumacetat zugegeben wird, präzipitiert es das SDS und damit auch die daran gebundenen Lipide und Proteine. So bleiben nur Plasmid-DNA, RNA und kleine chromosomale Fragmente in Lösung.

Nach Transformation des Vektors in DH5 alpha wurden die Bakterien in einer Übernachtskultur vermehrt. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden bei 5000 upm abzentrifugiert und das gewonnene Pellet in 300 µl Puffer 1 (2.1.2) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 (2.1.2) wurde sehr vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Dann wurden 300 µl Puffer 3 zugegeben und nach vorsichtigem Mischen erneut 15-20 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Lösung wurde bei 14000 upm 10 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurden 800 µl des Überstandes mit der gleichen Menge Chloroform ausgeschüttelt und erneut 10 Minuten bei 14000 upm abzentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 600 µl des Überstandes mit 420 µl Isopropanol ausgeschüttelt. Durch Zentrifugation bei 14000 upm für 30 Minuten wurde das

DNA-Pellet gewonnen, welches mit 70% Ethanol gewaschen wurde und nach Trocknung bei -20°C gelagert werden konnte.

### 3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem es möglich ist DNA-Fragmente exponentiell zu vermehren. Eine DNA-Polymerase aus einem thermostabilen Organismus (hier: *Thermus aquaticus*) verknüpft dabei ausgehend von einem Primer die einzelnen Nukleotide anhand einer Matrizen-DNA, indem die freien 3'-OH Gruppen der Desoxyribose mit den Nukleotiden analog der semikonservativen Replikation verbunden werden.

Durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C wurde die Matrizen-DNA in Einzelstränge aufgetrennt (Tab. 3.1, 3.2). Damit sich die Primer an die Einzelstränge anlagern konnten, wurde die Temperatur auf 56°C senkt. Die Verlängerung durch die Polymerase erfolgte bei 72°C. Insgesamt wurde dieser Zyklus 30 mal durchlaufen. Die PCR wurde als „Hot-Start-PCR“ durchgeführt, bei der die Polymerase erst in der einprogrammierten Pause zugegeben wurde, da diese Variante die Spezifität der Reaktion erhöht.

Tab.3.1: PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]	Zyklen	Beschreibung
1	95	180		Denaturierung
2	80	Pause		"Hot-Start"
3	95	120		Denaturierung
4	56	40		Anlagerung
5	72	180		Verlängerung
6	95	30	29x ab Schritt 4	Denaturierung
7	56	40		Anlagerung
8	72	600		Finale Verlängerung
9	15	Pause		Stopp

Tab.3.2: Pipettierschema für die PCR

Zusammensetzung	Volumen
Matrizen-DNA	2µl
Primer sense [10 pmol/µl]	2µl
Primer antisense [10 pmol/µl]	2µl
dNTP [10 mM]	2µl
Taq-Polymerase Puffer	5µl
Taq-Polymerase	0,5µl
Reinstwasser	ad 40µl

### 3.1.6 Restriktion durch Typ-II-Endonukleasen

Mit Hilfe der Endonukleasen ist es möglich, einen DNA-Strang in definierte Abschnitte zu spalten. Die Endonukleasen hydrolisieren die Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotids und der 3'-Hydroxygruppe des benachbarten Nukleotids. Dies geschieht innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz, die für jede Endonuklease einzigartig ist und durch Primer in Vektoren oder an einzelne Genabschnitte eingefügt werden kann.

In einem 10 µl-Reaktionsansatz wurden etwa 500 ng DNA und die Restriktionsnukleasen gemäß der Herstelleranweisung mit dem entsprechenden Puffer gemischt und für mehrere Stunden inkubiert. Bei einer Doppelrestriktion wurde der Puffer so gewählt, dass beide Enzyme größtmögliche Aktivität besaßen.

### 3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in der Agarosematrix nach ihrer Größe. Die Konzentration der Gele richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. In dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 1% gewählt, die eine Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 100-10.000 bp ermöglicht. Zur Auftrennung von kleineren Fragmenten muss die Konzentration erhöht werden. Die Trennschärfe wird durch die angelegte Spannung und die Agarosekonzentration des Gels bedingt. Die DNA-Banden können durch Zugabe von Ethidiumbromid im UV-Licht detektiert werden, da es bei 312 nm fluoresziert, nachdem es sich in die DNA eingelagert hat.

Für die Herstellung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und bis zur vollständigen Lösung geschwenkt. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/10 ml) zugegeben. Danach wurde der Taschenkamm eingesetzt und das Gel bis zur Aushärtung abgekühlt. Nach Entfernen des Kamms wurde das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden zur Erhöhung der Dichte mit einem 6xLaufpuffer gemischt und in die Taschen aufgetragen (10 µl). Durch einen ebenfalls aufgetragenen Größenmarker (DNA-Ladder-Mix) konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden. Die Auftrennung erfolgte über 30-45 Minuten bei 120 V.

Zur weiteren Nutzung der DNA-Fragmente wurden sie mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten und nach der Methode 3.1.8 aus dem Gel extrahiert.

### 3.1.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Verwendet wurde das Kit Nucleo Extract II der Firma Macherey & Nagel. In Gegenwart eines chaotropen Salzes wird die DNA in diesem System an Silicagel gebunden und direkt auf die NucleoSpin Extract II Säule pipettiert. Durch Waschen mit ethanolischem Waschpuffer werden Salze und Makromoleküle, aber auch Primer aus der PCR entfernt ohne auch kleine DNA Fragmente zu eluieren. Mit einem leicht alkalischen Puffer geringer Ionenstärke wird die DNA eluiert und kann bei -20°C gelagert werden.

### 3.1.9 Ligation

Durch eine Ligation ist es möglich, zwei zuvor linearisierte DNA-Fragmente enzymatisch zu verknüpfen. Dazu wird eine intermolekulare Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxyende des einen Fragmentes und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Fragmentes ausgebildet. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, heißt Ligase.

Die Enden der zu verbindenden Fragmente wurden zunächst mit Restriktionsenzymen verdaut, wobei die Phosphodiesterbindung an definierter Stelle innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz versetzt gespalten wurde, so dass „klebrige Enden“ entstanden. Für einen Ligationsansatz wurden etwa 50 ng Plasmid eingesetzt und mit dem einzusetzenden Insert im Überschuss (ca. 200 ng) versetzt. Außerdem wurden 1 µl 10x T<sub>4</sub>-Ligasepuffer und 0,5 µl T<sub>4</sub>-Ligase zugegeben und mit bidestilliertem Wasser ad 10 µl ergänzt. Dieser Ansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert.

### 3.1.10 Transformation in *E. coli*

Nachdem der Genabschnitt, der für das gewünschte Protein kodiert, in den Vektor eingefügt wurde, wurde das fertige Plasmid zur Vermehrung zunächst in DH5α transformiert und für die spätere Expression in BL 21 Zellen überführt.

Dazu wurden 50 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* (hergestellt nach Cohen et al., 1972) für 30 Minuten auf Eis mit 1,5 µl der Plasmidlösung nach Gelextraktion inkubiert. Danach wurden sie für 20 Sekunden einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C ausgesetzt und sofort wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 950 µl auf 37°C vorgewärmten SOC-Medium wurde dieser Ansatz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen bei 5000 upm für 5 Minuten abzentrifugiert und 800 µl Überstand abpipettiert. Danach wurden die Zellen in den verbleibenden 200 µl

Medium resuspendiert und auf eine LB-Platte mit Selektionsagar ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Transformation in kompetente BL 21-Zellen wurde den Zellen vor der Inkubation mit der Plasmidlösung eine  $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung zugesetzt und für 10 Minuten alle 2 Minuten vorsichtig geschüttelt.

### **3.1.11 Insertionskontrolle**

Da die verwendeten Vektoren mindestens ein Antibiotikumresistenzgen enthielten, konnte die Insertion einfach dadurch bewiesen werden, dass die Bakterien auf dem entsprechenden Selektionsagar wuchsen.

### **3.1.12 Proteinexpression**

Nach Aufzucht der Bakterien in 100 ml bzw. 400 ml LB-Selektionsmedium bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  wurde die Expression induziert, indem der Bakteriensuspension 10 mM IPTG zugegeben wurde und die Kolben bei 23°C im Schüttelschrank für 4 Stunden inkubiert wurden. Danach konnten die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 upm geerntet werden. An diesem Punkt konnte die Arbeit problemlos unterbrochen werden, da die Zellpellets bei -20°C für einige Wochen lagerungsfähig waren. Bei einer Aufreinigung für die Kristallisation wurde auf das Einfrieren verzichtet, da das Protein möglichst frisch sein sollte.

### **3.1.13 Zellaufschluss**

Das Bakterienpellet aus 400ml Medium (3.1.10) wurde mit in 6 ml Lysispuffer aufgenommen und am Sonifier durch Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Diese Lösung wurde bei 4°C 20 Minuten bei 13000 upm scharf abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde für die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet.

## **3.2 Methoden der Biochemie**

### **3.2.1 Affinitätschromatographie**

#### **3.2.1.1 Reinigung über Ni-NTA-Agarose**

Da die für diese Arbeit verwendeten rekombinaten Proteine alle mit einem Polyhistidinrest (His<sub>6</sub>-Tag) kloniert wurden, konnten sie schnell und unkompliziert mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt werden. Als Matrix diente Ni-NTA-Agarose (Ni-

Nitrilotriacetic Acid), der Firma Quiagen. Hier sind die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen über vier ihrer sechs freien Komplexbindstellen an Nitriloessigsäure gebunden, welche mit einer Sepharosematrix verknüpft ist. Über die zwei verbleibenden Bindestellen wird dann der Stickstoff von jeweils einem Histidin des 6xHis-Tags gebunden. Die Elution des Proteins kann entweder über eine Verringerung des pH-Wertes (pH 4.5-5.3) erreicht werden, da der protonierte Stickstoff nicht mehr an die Nickelionen binden kann, oder durch Zugabe von Imidazol zum Elutionspuffer. Imidazol bindet aufgrund der Strukturgleichheit ebenfalls an die Matrix und ist bei Konzentrationen zwischen 100-250 mM in der Lage, den His<sub>6</sub>-Tag von der Matrix zu verdrängen. Da die Reinigung unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, war eine Anhebung der Imidazolkonzentration schonender für das Protein. Durch den Zusatz von geringen Imidazolkonzentrationen zum Wasch- und Lysis-Puffer wurden unspezifische Bindungen von Fremdproteinen verhindert.

Die nach Zellaufschluss (3.1.11) gewonnene Lösung wurde im Batch-Verfahren mit 1 ml Ni-NTA-Agarose versetzt und für eine Stunde bei 4°C vorsichtig geschwenkt. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung über der Fritte einer leeren PD<sub>10</sub>-Säule von der Gelmatrix abgetrennt. Die Agarose mit dem gebundenen Protein wurde 5mal mit 1 ml Waschpuffer (80 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 5mal 0,5 ml Elutionspuffer (150 mM Imidazol).

Bei großen Proteinmengen wurde die benötigte Menge an Ni-NTA-Agarose nach Herstellerangaben berechnet. Demnach können 5-10 mg des Proteins mit His<sub>6</sub>-Tag pro ml Agarose gebunden werden.

### **3.2.1.2 Reinigung über Streptavidin-Agarose**

Die Streptavidin-Agarose wurde benutzt, um das biotinylierte Thrombin nach dem Schneiden des His<sub>6</sub>-Tags aus der Proteinlösung zu entfernen. Nach Packungsbeilage des Herstellers wurde die benötigte Menge an Streptavidin-Agarose berechnet. Demnach binden 400 µl der 50%-igen Agarose-Lösung 20 Units biotinyliertes Thrombin in einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Während der Inkubation wurde die Lösung vorsichtig geschwenkt.

### **3.2.2 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen**

Obwohl das Imidazol in den Inkubationsansätzen nicht gestört hat, musste es für die Lagerung des Proteins bei -20°C und die Kristallisationsansätze entfernt werden. Ebenso war es notwendig, die Ionenstärke bei den Aufreinigungen für die Kristallisation

stark zu reduzieren. Dafür wurden die nach 3.2.1 erhaltenen Proteinlösungen durch Größenausschlusschromatographie entsalzt.

Hierzu wurden PD<sub>10</sub>-Säulen (Bettvolumen 3,5 ml, Trennbereich 1000-5000 Da, Fa. Amersham Biosciences) mit 30 ml des Elutionspuffers equilibriert. Danach wurden 2,5 ml der Proteinlösung aus 3.2.1 aufgebracht. Nachdem sie vollständig in das Trennbett eingezogen war, erfolgte die Elution des Proteins mit 3,5 ml Elutionspuffer. Während niedermolekulare Salze in den Poren der Gelmatrix zurückgehalten wurden, konnte das Protein mit dem Ausschlussvolumen eluiert werden. Für Proteinlösungen, die für Inkubationen genutzt werden sollten, wurde 0,1 M Phosphatpuffer pH 7.25 (2.1.3, Puffer zur Enzyminkubation) als Elutionspuffer gewählt, während für Proteinchargen, die für die Kristallisation genutzt werden sollten, 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.75 (2.1.3, Puffer zur Gelfiltration und für die Kristallisation) als Elutionspuffer verwendet wurde. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde nach 3.2.3 bestimmt.

### **3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die schnelle photometrische Bestimmung nach Bradford (1976) verwendet. Grundlage dieser Messung ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 bei der Bindung an die Seitenketten von Proteinen. Der ungebundene kationische Trimethylfarbstoff hat ein Absorptionsmaximum von 470 nm, welches sich durch Komplexbildung mit kationischen Seitenketten in saurer Lösung auf 595 nm verschiebt, da der Farbstoff dann in seiner anionischen Sulfonatform stabilisiert wird.

Für die Bestimmung der Konzentration wurden 1-10 µl der Proteinlösung mit der jeweiligen Pufferlösung, in der das Protein vorlag, ad 10 µl versetzt. Nach Zugabe von 900 µl Bradford-Reagenz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Lösung wurde gegen einen Blindwert der 100 µl des Puffers und 900 µl Bradford-Reagenz enthielt, bei 595 nm vermessen.

Anhand einer Kalibriergeraden, die zuvor mit BSA im gleichen Konzentrationsbereich (1-20 µg/ml) erstellt wurde, konnte der Proteingehalt berechnet werden.



### 3.2.4 Proteingele

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten von Proteingelen verwendet. Zum einen SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), die verwendet wurde um Aussagen über Identität und Reinheit der Proteine treffen zu können, und zum Anderen das native Proteingel, wofür die Proteine nicht denaturiert werden und daher auch in ihrer natürlichen Konformation detektiert werden können.

#### 3.2.4.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) werden denaturierte Proteine in einem Molekularsieb auf Polyacrylamidbasis entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Porengröße des Gels ist dabei von der Polyacrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad durch Bisacrylamid abhängig.

Beim Aufkochen der Proben mit einem Überschuss SDS wird die Struktur der Proteine aufgelöst und die SDS-Moleküle lagern sich an die Oberfläche der Proteine an, so dass deren Eigenladung maskiert wird und alle Proteine an der Außenseite negativ geladen sind. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinketten im Gel ist dann nur noch größenabhängig. Zum Auflösen von Disulfidbrücken wird reduzierendes  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben.

#### *Herstellung des Gels*

Das Verfahren nach Laemmli sieht ein diskontinuierliches System vor, bei dem sich Sammel- und Trenngel in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Die Proben werden zunächst in einem Sammelgel konzentriert und die Auftrennung erfolgt erst im darunterliegenden Trenngel.

Nachdem die Gelkammern nach Herstelleranweisung zusammengebaut wurden, wurde das Trenngel hergestellt, indem Wasser bidest., Bisacrylamid, 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8 und 10% SDS zusammenpipettiert und durch leichtes Schwenken vermischt wurden. Nach Zugabe von 10% APS als Radikalstarter und TEMED als Polymerisationskatalysator wurde erneut vorsichtig gemischt und die Lösung zügig zwischen die Glasplatten pipettiert. Damit das Gel während der Polymerisierung nicht austrocknet, wurde es im flüssigen Zustand sehr vorsichtig mit etwas Wasser bidest. überschichtet. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur war die Polymerisation abgeschlossen. Das Wasser wurde mit einem Filterpapier vorsichtig entfernt. Für das Sammelgel wurde ebenfalls Wasser bidest., 10% SDS, 10% APS und TEMED verwendet, allerdings wurde das Bisacryla-

mid in einer geringeren Konzentration eingesetzt und der Tris-Puffer war im Gegensatz zum Trenngel nur 0,5 M mit einem pH-Wert von 6,8. Nachdem das Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel pipettiert wurde, wurde ein Haifischkamm mit 10 Probentaschen eingesetzt. Dieser wurde erst kurz vor dem Lauf entfernt.

### ***Probenvorbereitung***

Für die Proben wurden standardmäßig 10 µl der Proteinlösung mit 10 µl Probenpuffer gemischt und 10 Minuten bei 95°C im Heizblock gekocht. Von dieser Lösung wurden 10 µl in die Taschen pipettiert, die zuvor einmal mit Laufpuffer gespült wurden. Als Größenmarker diente die „Page ruler unstained protein ladder“ der Firma Fermentas.

### ***Elektrophorese***

Die Elektrophorese erfolgte unter Anlegen einer Stromstärke von 25 mA für das Sammelgel. Nachdem die Proben in das Trenngel eingedrungen waren, wurde diese auf 35mA erhöht. Die entstehende Wärme wurde durch Wasserkühlung abgeleitet und nach etwa 3 Stunden Laufzeit konnte man anhand des Probenpuffers erkennen, dass die Proben das Gel passiert hatten und der Lauf wurde beendet.

#### **3.2.4.2 Native Proteingele**

Bei den nativen Proteingelen muss der pH-Wert der Gele den Proteinen angepasst werden, da diese das Gel anhand ihrer Ladung passieren. Für saure Proteine verwendet man ein basisches Gel und für basische Proteine ein saures Gel. Da der isoelektrische Punkt der Proteine zwischen 6.1 und 7 lag, wurde hier ein basisches Gel gewählt.

### ***Herstellung, Probenvorbereitung und Elektrophorese***

Die Herstellung erfolgte analog der Herstellung der SDS-Gele, wobei auf den SDS-Zusatz und  $\beta$ -Mercaptoethanol im Gel und im Laufpuffer verzichtet wurde. Die Proben wurden nicht gekocht, sondern nur vorsichtig mit dem Probenpuffer für native Gele gemischt.

Da für die nativen Gele die Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN® Tetra Cell der Firma BIO-RAD verwendet wurde, in die deutlich kleinere Gele eingesetzt wurden, konnte die Laufzeit auf etwa 45 Minuten bei 200 mV reduziert werden.

### **3.2.5 Färben der Proteingele**

Sowohl die SDS-Gele als auch die nativen Gele wurden mit einer Coomassie-Färbung eingefärbt. Dazu wurde das Trenngel nach der Elektrophorese vom Sammelgel abgetrennt und für eine Stunde in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Danach wurde das Gel über Nacht in Entfärberlösung inkubiert.

### **3.2.6 Dokumentation der Proteingele**

Für die Dokumentation wurden die Gele mit dem Fotoscanner MultiImage Light Cabinet der Firma Alpha Innotech unter Verwendung von VIS-Durchlicht eingescannt und gespeichert.

### **3.2.7 Konzentrieren der Proteinlösung für die Kristallisation**

Für die Kristallisationsansätze musste das Protein am Ende des Reinigungsprozesses in hoher Konzentration (ca. 20 mg/ml) vorliegen. Dazu wurde die Proteinlösung aus 3.2.2 mit Vivaspin-Zentrifugenkonzentratoren der Firma Satorius eingeeengt. Die Filtermembran dieser Konzentratoren hatte ein Cut-off Volumen von 10 kDa, wodurch die Proteine mit einer Größe von 86 kDa über der Membran zurückgehalten wurden. Die Zentrifugation wurde bei 6000 upm und 4°C durchgeführt. Für die anschließende Gelfiltration musste die Proteinlösung auf einen Milliliter eingeeengt werden. Da sich im Laufe der Zentrifugation Aggregate bildeten, mussten diese vor der Gelfiltration scharf abzentrifugiert werden (14000 upm, 4°C, 15 Minuten).

### **3.2.8 Lagerung gereinigter Proteine**

Für Inkubationen war es möglich, Aliquots dieser Lösung bei -20°C zu lagern, wobei die Aktivität durch einmaliges Einfrieren und Wiederauftauen je nach Protein um 5-30% zurückging. Ohne weiteren Aktivitätsverlust war eine Lagerung von bis zu einem Jahr möglich. Enzymchargen, die für die Kristallisationsansätze genutzt wurden, wurden nicht eingefroren, sondern immer frisch verwendet.

### **3.2.9 Abspalten des Polyhistidinrestes für die Kristallographie**

Für die Kristallisationsansätze war es zum Teil notwendig, den Polyhistidinrest abzutrennen, da nach wie vor nicht eindeutig geklärt ist, ob der polare Histidinrest die Faltung des Proteins behindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen Thrombin, das mit einem zusätzlichen Biotin-Tag versehen war, Thrombin ohne zusätzliches Affini-

tätstag (restriktion grade) und zum anderen die TEV-Protease, die selbst ein His-Tag trug, als Restriktionsenzyme verwendet.

### 3.2.9.1 Abspalten des Polyhistidinrestes mit Thrombin

Für die Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tags mit Thrombin war es nötig, dass die Proteine in einen Vektor kloniert wurden, der eine Schnittstelle für Thrombin zwischen dem His<sub>6</sub>-Tag und der Startsequenz für das Protein besaß. Diese Voraussetzungen waren beim Vektor pET28c gegeben. Die einzusetzende Thrombinmenge wurde anhand der gemessenen Proteinmenge auf Grundlage der Herstellerangaben des Thrombins berechnet (1 Unit Thrombin schneidet 1 mg Protein). Die Proteinlösung wurde auf 1 ml eingengt und dann 3 Stunden bei 30°C mit dem Thrombin inkubiert. Danach wurde die Lösung scharf abzentrifugiert (14000 upm, 4°C, 15 Minuten).

Wenn das „restriktion grade“-Thrombin benutzt wurde, wurde die Lösung nach Zentrifugation in die FPLC eingespritzt und einer Gelfiltration unterworfen.

Bei Verwendung des Thrombins mit dem Biotin-Tag wurde das Thrombin im Anschluss an das Schneiden durch Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Agarose aus dem Ansatz entfernt.

### 3.2.9.2 Abspalten des Polyhistidinrestes mit TEV-Protease

Bei der TEV-Protease (*Tabaco-Etch-Virus*) handelt es sich um ein Enzym, dass zum Abschneiden des His<sub>6</sub>-Tags verwendet wurde. Da das Enzym selber ein His<sub>6</sub>-Tag besitzt, ist es nach dem Schneiden leicht durch erneutes Binden an Ni-NTA-Agarose aus dem Ansatz zu entfernen. Für die Verwendung der TEV-Protease mussten die Proteine zunächst mit einer Schnittstelle für dieses Enzym versehen werden, die direkt vor den Beginn des Proteins kloniert wurde. Dazu wurden die entsprechenden Primer synthetisiert und dann zusammen mit dem jeweiligen Protein in den Vektor pRSet B kloniert. Das Schneiden erfolgte mit der auf einen Milliliter eingengten Proteinlösung und wurde bei 4°C unter leichtem Schwenken für 48 Stunden durchgeführt. Dabei wurde TEV-Protease eingesetzt, die ein Geschenk der Uni Halle war, da die Konzentration der selbst hergestellten TEV-Protease zu gering war, um eine so große Proteinmenge zu schneiden. Die eingestezte Lösung hatte eine Konzentration von 2,34 mg/ml (70 µM) und wurde im Verhältnis 1:50 mit dem Zielprotein versetzt (2 ml BIS der Konzentration 18 mg/ml wurden mit 120 µl TEV-Potease geschnitten). Danach wurde die TEV-Protease über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (3.2.1) entfernt. Das

geschnittene Protein wurde dabei im Waschpuffer eluiert und entsprechend 3.2.2 umgepuffert. Die resultierenden 3,5 ml Proteinlösung wurden wieder auf 1 ml eingengt und einer Gelfiltration unterworfen.

### 3.2.10 Proteinreinigung mittels Gelfiltration (FPLC)

Bei der Gelfiltration handelt es sich um eine Größenausschlusschromatographie, in der das Protein am Ende der Reinigung für die Kristallisation von letzten Verunreinigungen und eventuell gebildeten Proteinpolymeren abgetrennt wurde. Die Auftrennung erfolgte nach Größe der Proteine über eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 High Resolution Säule der Firma GE Healthcare mittels FPLC (Fast-Protein-Liquid-Chromatography). Die Matrix dieser Säule besteht aus einem verlinkten Copolymer aus Allyldextran und N,N-methylenbisacrylamid. Die Porengröße dieser Säule erlaubt eine Auftrennung von Proteinen zwischen 10 und 1500 kDa. Größere Proteine werden zuerst eluiert, während kleinere in den Poren der Gelmatrix zurückgehalten werden.

Nachdem die Säule nach Herstellerangaben mit dem Puffer zur Enzyminkubation (2.1.3) equilibriert wurde, wurde die auf 1ml eingengte Proteinlösung mit einer Spritze in die Anlage injiziert. Die Reinigung erfolgte nach folgendem Programm (Tab 3.3).

Tab.3.3: FPLC-Programm

Volumen [ml]	Aktion
0	Set Zero Baseline
	UV-Lampe an
	UV-Detektor an
	Probe injizieren
1	Isokratischer Flow (Flussrate: 0,5ml/Min. für 240ml)
20	Beginn der Fraktionssammlung (jeweils 2ml)
241	UV-Lampe aus
241	Protokoll Endeb

## 3.3 Methoden der Analytik

### 3.3.1 Inkubationen

#### 3.3.1.1 Standardinkubationen

Diese Art der Inkubationen wurden durchgeführt, um die Aktivität der gereinigten Proteine zu überprüfen. Es handelt sich um einen in unserer Gruppe üblichen Standard-Ansatz, der sich für die Inkubation von Polyketidsynthasen bewährt hat (Liu, 2003).

Dazu wurden 2-5 µg des jeweiligen Proteins mit 10 µl Malonyl-CoA (Stammlösung 1:5 verdünnt) und 10 µl Starter-CoA (Stammlösung 1:10 verdünnt) gemischt und mit Puffer zur Enzyminkubation (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.25) ad 250 µl aufgefüllt (Tab. 3.4). Nachdem der Ansatz gründlich gevortext und kurz zentrifugiert wurde (10 Sekunden, 5000 upm) wurde für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 27,5 µl 50% Essigsäure gestoppt und die enzymatischen Produkte 2mal mit 250 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Die beiden Ethylacetatphasen wurden vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge (RVC 2-18, Fa. Christ) zur Trockne eingedampft (50 Minuten, 37°C). Die Negativkontrolle wurde in gleicher Weise durchgeführt, allerdings wurde dafür das Protein 10 Minuten mit der Pufferlösung gekocht und abgekühlt, bevor Malonyl-CoA und das jeweilige Starter-CoA zugegeben wurden.

Tab.3.4: Pipettierschema für Inkubationen

	Volumen	Endkonzentration
Enzym		2 bzw. 5µg
Malonyl-CoA (Stammlösung 1:5)	10µl	~20µM
Starter CoA (Stammlösung 1:10)	10µl	~10µM
0,1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7.25	ad 250µl	

### 3.3.1.2 Inkubationen für Inhibitionsversuche

#### 3.3.1.2.1 Unter Verwendung von PD10-Säulen

Zunächst musste bei diesen Ansätzen das inhibierende 3-Hydroxybenzoyl-Triketid im aktiven Zentrum des Proteins erzeugt werden. Dazu wurden 5 µg der BPS-Mutante BPS-Mutante T135L zunächst für 5 Minuten mit 20 µM Malonyl-CoA und 20 µM 3-Hydroxybenzoyl-CoA bei 37°C vorinkubiert. Dieser Ansatz wurde über das His<sub>6</sub>-Tag der Mutante in einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C an Ni-NTA-Agarose gebunden. Dann wurde die Lösung in einer leeren PD<sub>10</sub>-Säule durch Spülen mit Inkubationspuffer von den CoA-Estern befreit. Danach wurde das Protein mit Elutionspuffer von der Ni-NTA-Agarose getrennt und durch Zugabe von ~21 µM Malonyl-CoA und ~7 µM Benzoyl-CoA für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsprodukte wurden mit Ethylacetat ausgeschüttelt und zur Trockne eingedampft. Da die aufgenommenen Chromatogramme keine auswertbaren Peaks zeigten, wurde der Inkubationsansatz 7-fach erhöht und das Inkubationsvolumen auf 500 µl erhöht.

Ein Blindwert wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, wobei allerdings auf die Zugabe von 3-Hydroxybenzoyl-CoA für die Vorinkubation verzichtet wurde.

### 3.3.1.2.2 Inhibitionsversuche ohne Entfernung der CoA-Ester aus dem Ansatz

Auch für diese Experimente wurde das inhibierende 3-Hydroxybenzoyl-Triketid im aktiven Zentrum gebildet, indem 5 µg der Mutante mit ~21 µM Malonyl-CoA und variierenden Konzentrationen 3-Hydroxy-Benzoyl-CoA (2,1-21,6 µM) bei 37°C vorinkubiert wurden. Danach wurden ~7 µM Benzoyl-CoA zugegeben und gut gemischt. Die Inkubation wurde dann bei 37°C fortgesetzt wurde nach 5-25 Minuten mit 27,5 µl 50% Essigsäure gestoppt. Nach zweimaligem Ausschütteln mit 250 µl Ethylacetat wurden die vereinigten Ethylacetatphasen zur Trockne eingedampft.

In gleicher Weise wurden Ansätze mit ~21 µM Malonyl-CoA und variierenden Konzentrationen Acetyl-CoA (2,1-21,7 µM) für die Vorinkubation durchgeführt, welches von der Benzophenonsynthase nicht als Startersubstrat akzeptiert wird.

Ein Blindwert wurde auf gleiche Weise ermittelt, wobei die Vorinkubation nur mit Proteinlösung durchgeführt wurde.

### 3.3.1.3 Inkubationen zur Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums

Für die Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums wurde der Inkubationsansatz halbiert, um Substrate zu sparen.

Tab.3.5: Pipettierschema für die Bestimmung des Temperaturoptimums (halbierter Inkubationsansatz)

	Volumen [µl]	Endkonzentration
WtPKS1	8.5	20µg
WtPKS2	14.5	20µg
Malonyl-CoA	40	375µM
Coumaryl-CoA	20	220µM
Puffer (pH 7.25)	ad 125	

Tab.3.6: Pipettierschema zur Bestimmung des pH-Optimums (halbierter Inkubationsansatz)

	Volumen [µl]	Endkonzentration
WtPKS1	8.5	20µg
WtPKS2	14.5	20µg
Malonyl-CoA	40	375µM
Coumaryl-CoA	20	220µM
Puffer (pH variabel)	ad 125	

### 3.3.1.4 Co-Inkubationen mit Wt PKS1 und Wt PKS2

Für diese Ansätze wurden jeweils 40 µg der beiden Proteine mit den zu testenden Startersubstraten und Malonyl-CoA in einem 250 µl Ansatz für 30 Minuten inkubiert. Als Puffer wurde 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pH 8,5 mit 1 mM DTT verwendet. Die Konzentrationen der Startersubstrate betrug dabei für 4-Cumaroyl-CoA zwischen 12,5 und 800 µM und für Cinnamoyl-CoA 25-200 µM. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 27,5 µl 50% Essigsäure gestoppt und zweimal mit je 250 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedampft.

### 3.3.2 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie diente zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Inkubationsprodukte (Tab 3.5-3.8).

Bei diesem Verfahren werden Substanzgemische nach ihren Bindungseigenschaften zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt. Als stationäre Phase dienten verschiedene C<sub>18</sub>-Umkehrphasen, während die mobile Phase von Methanol/Wasser-Gemischen oder Acetonitril/Wasser-Gemischen gebildet wurde. Das Mischverhältnis der mobilen Phase wurde über verschiedene Gradientenprogramme gesteuert und die Detektion erfolgte über einen DAD-Detektor mittels online-UV-Spektroskopie. Die getrockneten Proben nach 3.3.1 wurden mit 50 µl Methanol aufgenommen, wovon dann 20 µl injiziert wurden.

Tab.3.7: Instrumentierung HPLC

Gerät	T135L	WDF
HPLC	Waters	Agilent Technologies, 1260 Infinity
Säule	Hypersil Gold (5µm, 4.6 x 150mm; Thermo)	YMC Pack Pro C18 (250 x 4.6mm, 5µm)
Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump	Agilent Technologies, 1260 Infinity Quat. Pump VL
Detektor	Waters <sup>TM</sup> 996 Photodiode Array Detector	Agilent Technologies, 1260 Infinity DAD VL
Fließmittel	Methanol : Wasser (1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Acetonitril : Wasser (pH 2.07, TFA)
Flowrate	0,5ml/ Min.	0,7ml / Min.
Injektionsvolumen	20µl	20µl
Software	Millenium <sup>32</sup>	Agilent Chemstation



Tab.3.8: Gradient für die Auswertung der Inhibitionsversuche

Zeit [Min.]	Organische Phase [%]
0	50
2	50
17	70
25	90
26	100
30	100
32	50

Tab.3.9: Gradient für die Analytik des Bisdesmethoxycurcumins

Zeit [Min.]	Organische Phase [%]
0	10
5	10
35	100
40	100
41	10
45	10

Tab.3.10: Gradient für die Analytik aller Diarylheptanoide

Zeit [Min.]	Organische Phase [%]
0	60
25	100
35	100
36	60
41	60

### 3.3.3 LC-ESI-MS

Diese Analyse der Proben erfolgte in Jena durch PD Dr. Bernd Schneider. Dazu wurden die nach 3.3.1.3 erhaltenen Proben zunächst über eine Agilent Zorbax SB-C18 Säule (4,6x150 mm, Partikelgröße 3,5 µm) mit einer Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. und 25°C Säulentemperatur aufgetrennt (Tab. 3.9). Die mobile Phase bestand aus Methanol (B) und Wasser (A), die jeweils 0,1% Ameisensäure enthielten. Die UV-Spektren wurden mit einem DAD Detektor der Firma Bruker (J&M Analytik AG, Essingen, Deutschland) bei 215, 254 und 420 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Bruker Hystar v3.2.

Tab.3.11: Gradient für die LC-ESI-MS

Zeit [Min.]	Organische Phase [%]
0	0
3	0
25	80
35	80
37	98
45	100
60	100
65	0
75	0

Die Detektion der MS-Signale erfolgte über ein Esquire 3000 ESI ion-trap Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Das Fließmittel wurde im Verhältnis 1:1 aufgesplittet, bevor es in die Vernebelungskammer eintrat (Tab. 3.10)

Tab.3.12: Instrumentierung MS

Gas Temperatur	330°C
Trockengas Flußrate	12 l/min.
Vernebelungsdruck	35 psi
Kapillare	4300V
Skimmer	34V
Kapillaraustrittsspannung	107V
Aufnahmebereich	m/z 150-1600
Software	Analysis v.3.3, Bruker Daltonics
	Esquire Control Software v.5.3, Bruker Daltonics

### 3.3.4 NMR

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (500.13 MHz) wurden ebenfalls von PD Dr. Bernd Schneider in Jena mit einem Bruker Avance 500 NMR Spektrometer aufgenommen, welches mit einer TCI CryoProbe TM (5 mm) ausgestattet war (Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland). Die nach 3.3.1.3 erhaltenen Proben wurden zunächst ohne vorherige Auftrennung in 80  $\mu\text{l}$  Aceton- $\text{d}_6$  (99,95%) aufgenommen und in einer 2 mm Kapillare mit Tetramethylsilan als internem Standard vermessen. Für die Analyse der Ergebnisse wurde die Topspin 2.1 Software (Fa. Bruker) verwendet.

### **3.4 Methoden der Proteinkristallisierung**

#### **3.4.1 Kristallisierung**

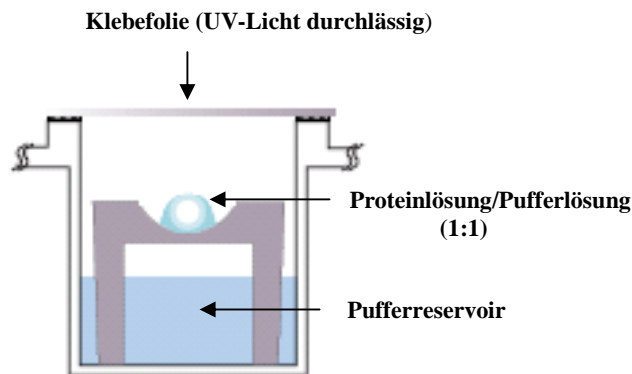
Die Kristallisierung wurde nach dem Dampfdiffusionsverfahren durchgeführt. Hierbei wird die hochkonzentrierte Proteinlösung (Lösungsmittel 10 mM Tris-HCl, pH 7,75) 1:1 mit dem jeweiligen Fällungsmittel versetzt. In einer gesättigten Fällungsmittel-Atmosphäre diffundiert das Wasser aus der Proteinlösung. So wird langsam die Fällungsgrenze des Proteins erreicht und es kommt zur Kristallisation.

Für das anfängliche Screening nach den richtigen Pufferbedingungen wurde die „sitting drop“ Technik angewandt. Diese konnte mithilfe eines Pipettierroboters durchgeführt werden. Für die Optimierung der Bedingungen wurde dann auf die manuell durchgeführte „hanging drop“ Methode gewechselt. Für beide Techniken wurden die Proteine in hochkonzentrierter Lösung von 9-30 mg/ml eingesetzt.

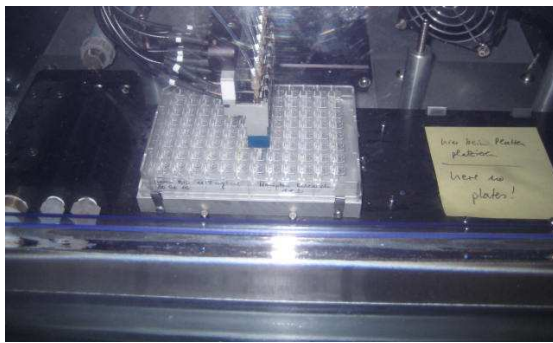
##### **3.4.1.1 Kristallisation nach der „sitting drop“ Methode**

Die „sitting drop“ Methode wurde für das Screening nach den optimalen Kristallisationsbedingungen verwendet, da auf diese Weise sehr viele unterschiedliche Pufferbedingungen unter minimalem Protein- und Pufferverbrauch angesetzt werden konnten.

In die 96 Reservoirkammern der Proteinkristallisationsmikroplatten (Fa. Greiner) wurden dazu zunächst manuell jeweils 70 µl der jeweiligen Kristallisationspuffer pipettiert. In einem Probenreservoir wurden die Proteinlösungen (ggf. unterschiedliche Konzentrationen) bereitgestellt. Der Pipettierroboter (Cartesian, Fa. Zinsser Analytic) pipettierte daraufhin jeweils 3 nl der Pufferlösung und 3 nl der jeweiligen Proteinlösung in die Vertiefung der Platten über dem dazugehörigen Pufferreservoir. Danach wurden die Platten mit einer UV-Licht durchlässigen Folie luftdicht verschlossen und in einen Fotoscanner eingelegt. Die Dokumentation der Kristallisation erfolgte durch Einscannen der einzelnen Kammern bei normalem VIS-Licht und UV-Licht in regelmäßigen Zeiabständen. Die Bilder waren mit einem Passwort online zugänglich und konnten so auch aus Braunschweig beobachtet werden.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des „sitting drop“ Verfahrens

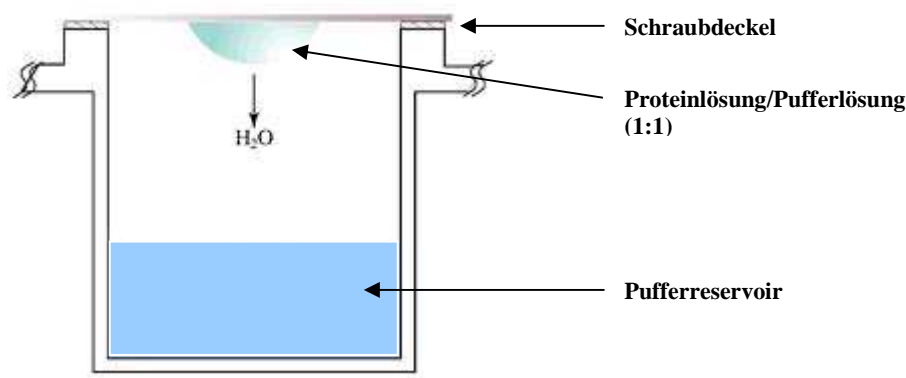


**Abbildung 14:** Pipettierroboter Cartesian

#### 3.4.1.2 Kristallisation nach der „hanging drop“ Methode

Die „hanging drop“ Methode wurde verwendet, um größere Kristalle zu gewinnen. Da das Pipettieren manuell erfolgen musste und größere Proteinmengen aufgewendet werden mussten, wurde diese Technik erst zum Fine-Screening herangezogen, nachdem schon mit der „sitting drop“ Methode Pufferbedingungen gefunden wurden, bei denen Kristallbildung erfolgte. Beim Fine-Screening wurde der pH-Wert der Pufferlösungen in 0,2-0,5 Einheiten verändert.

Für diese Methode wurden 24-well Kristallisationsplatten verwendet. In das Pufferreservoir wurden 500 µl Pufferlösung pipettiert. Dann wurde im Schraubdeckel der Gefäße jeweils ein 2-5 µl großer Tropfen der Proteinlösung mit der gleichen Menge Pufferlösung aus dem Reservoir vorsichtig gemischt. Danach wurden die Gefäße vorsichtig verschlossen. Es war möglich drei verschiedene Tropfen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen pro Well zu pipettieren.

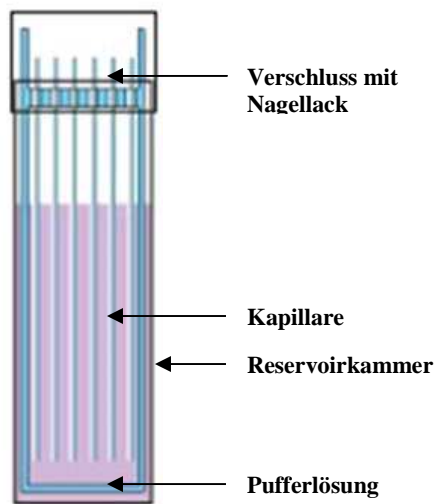


**Abbildung 15:** Schematische Darstellung des „hanging drop“ Verfahrens ( nach Holbrook et al., 2010)

### 3.4.2 Kapillarkristallisierung

Die Kristallisierung in einer Kapillare ist eine schnelle Möglichkeit, größere Kristalle zu gewinnen, die dann auch direkt in der Kapillare vermessen werden können. Da pro Kapillare nur eine Pufferbedingung getestet werden kann und die Kapillaren per Hand gefüllt werden müssen, wird diese Methode erst eingesetzt, wenn man im Roboter-Screening Bedingungen gefunden hat, bei denen Kristallbildung erfolgte.

Zunächst wurde die Reservoirkammer der Granada Crystallization Box (Fa. Hampton Research) mit der entsprechenden Pufferlösung gefüllt (~7 ml). Danach wurden die einzelnen Kapillaren mit der Proteinelösung befüllt und durch Eintauchen in eine 1,5%ige Agaroselösung gegen Auslaufen gesichert. Nachdem das obere Ende der Kapillaren mit Nagellack versiegelt wurde, wurden die Kapillaren in die Pufferlösung eingesetzt. Durch die Agarose konnte die Pufferlösung nach und nach in die Kapillare einziehen. Bei dem für die Kristallisation optimalen Misch-Verhältnis zwischen Puffer- und Proteinelösung sollte die Kristallbildung erfolgen. Eingesetzt wurden Kapillaren mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,3 mm. Eine Reservoirkammer umfasste sechs Kapillaren.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der Kapillarmethode (Hampton Research)

### 3.4.3 Seeding

Das Seeding wird verwendet, um die Kristallbildung zu optimieren. Dazu wird der gebildete Kristall als Kristallisationskeim in eine Mischung aus frischer Pufferlösung und Proteinlösung eingebettet. In dieser Arbeit wurde das Seeding für einige Bedingungen der BPS verwendet. Dazu wurden Kristalle aus dem Ansatz „BPS (7,5 und 11,5 mg/ml) hanging drop + Additiva“ verwendet und in den Kristallisationspuffer 2% Dioxan, 0,1 M Bicin pH 9,0, 10% PEG 20000 überführt. Das Fischen der Kristalle erfolgte unter dem Mikroskop durch eine Öse aus autoklaviertem Pferdehaar.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Co-Inkubation von WtPKS1 und WtPKS2

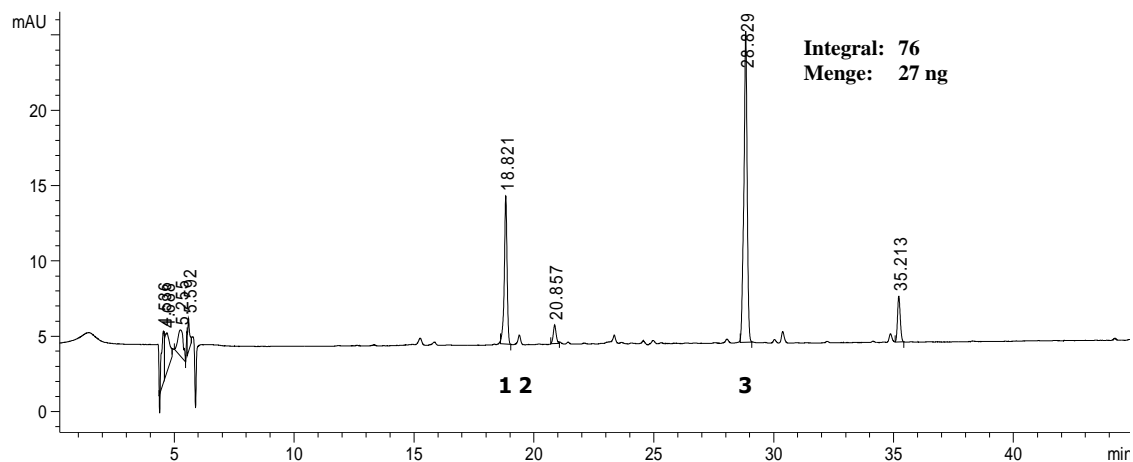
Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. die Bildung der Diarylheptanoide in der Pflanze *W. thyrsoiflora*, basierend auf den Ergebnissen von Brand (2005, 2006) aufgeklärt werden. Die in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Bernd Schneider, MPI für chemische Ökologie (Jena) klonierten Enzyme wurden mir für weiterführende Untersuchungen als Dauerkulturen zur Verfügung gestellt. Da in Jena bisher ausschließlich radioaktiv gearbeitet wurde, war ein weiteres Ziel der Arbeit, neben der Detektion von enzymatisch gebildeten Diarylheptanoiden, auch die Umstellung auf nicht-radioaktive Enzymansätze.

#### 4.1.1 Identifizierung gebildeter Diarylheptanoide

Da die radioaktive Bestimmung der Inkubationsprodukte deutlich sensitiver ist, wurde der von Dr. Brand zugrunde gelegte Inkubationsansatz zunächst vervielfältigt (3.3.1.3). Durch eine Erhöhung der Protein- und CoA-Ester-Menge und Verwendung einer speziellen HPLC-Säule (YMC Pack Pro C18, 250 x 4.6mm, 5µm), die für die Detektion von Curcuminen ausgelegt ist, war es möglich, die gebildeten Diarylheptanoide zu detektieren. Eine Optimierung der Bedingungen erfolgte dann in weiteren Experimenten wie folgt.

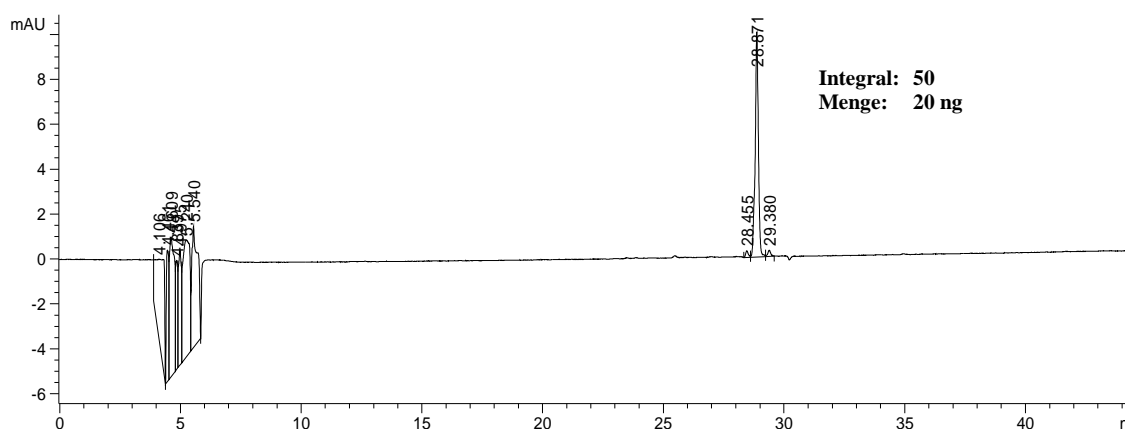
##### 4.1.1.1 Inkubationen mit 4-Cumaroyl-CoA

In vorausgegangenen Experimenten wurde die WtPKS1 bereits von Brand (2005) charakterisiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde zunächst 4-Cumaroyl-CoA für die Inkubationen eingesetzt. In Inkubationen mit beiden Enzymen, Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA konnte das erwartete Diarylheptanoid Bisdesmethoxycurcumin mittels HPLC-DAD detektiert werden. Durch eine Co-Chromatographie mit der authentischen Referenz, die im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie (Jena) in der AG von PD Dr. Schneider hergestellt wurde, konnte dieses Ergebnis untermauert werden. Die online-Spektren von Referenz und dem entsprechenden Peak der Inkubation waren identisch. Die eindeutige Identifizierung des Diarylheptanoids erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schneider in Jena mittels LC-ESI-MS.



**Abbildung 17:** HPLC-Chromatogramm einer Inkubation mit Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA (404 nm). 1, p-Hydroxybenzalaceton; 2, p-Hydroxystyrylpyron; 3, Bisdesmethoxycurcumin

Das HPLC-Chromatogramm in Abb.17 zeigt drei Peaks von enzymatischen Produkten. Beim Peak 1 ( $t_R = 18.8$  min) handelt es sich um p-Hydroxybenzalaceton und bei Peak 2 um p-Hydroxystyrylpyron ( $t_R = 20.8$  min). Das Bisdesmethoxycurcumin (Peak 3) wird nach 28.8 Minuten eluiert. Über eine Eichgerade, die mit der chemisch-synthetischen Referenz aufgenommen wurde, konnte die Menge des gebildeten Bisdesmethoxycurcumins mit 27,7 ng (Integrationsfläche: 76) bestimmt werden. In Ansätzen mit gekochten Proteinen traten die obigen Produkte nicht auf, im Gegensatz zu den Peaks bei  $t_R = 20,8$  min und  $t_R = 35,2$  min, die unspezifisch sind und auch in Proben mit zuvor denaturierten Proteinen gefunden wurden.

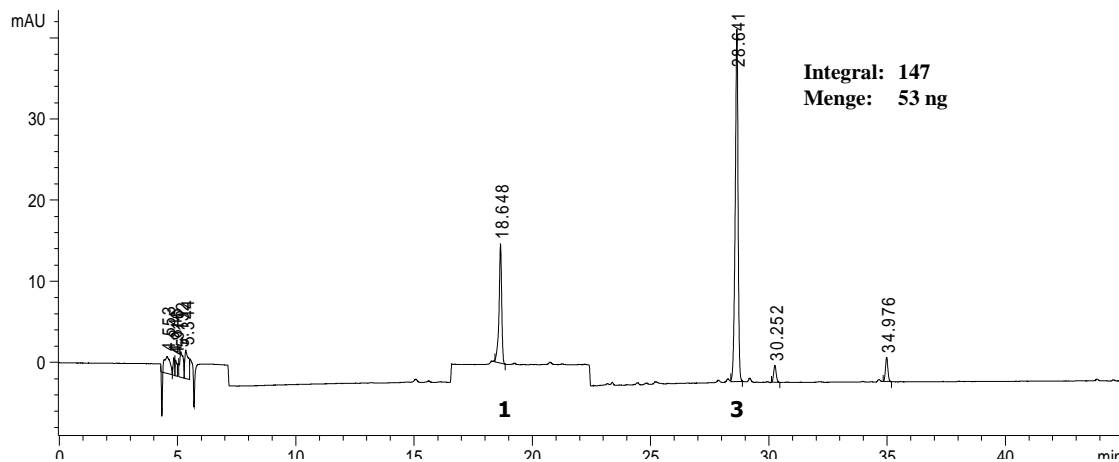


**Abbildung 18:** HPLC-Chromatogramm der Referenz Bisdesmethoxycurcumin (404 nm)

Abbildung 18 zeigt ein Chromatogramm der Referenz Bisdesmethoxycurcumin, die bei einer Retentionszeit von  $t_R = 20,8$  min eluiert wird. Der Peak, der mit einer Fläche von 50 integriert wurde, entspricht einer Menge von 20 ng. Für die Co-Chromatographie



wurde ein Doppel der obigen Inkubation (Abb. 17) in Referenzlösung (Abb. 18) statt reinem Methanol aufgenommen, so dass sich der Peak 3 im Chromatogramm der Co-Inkubation (Abb. 19) aus 20 ng Referenz und dem Inkubationsprodukt zusammensetzt, welches einer Menge von etwa 27 ng im Reaktionsansatz gebildetem Bisdesmethoxycurcumin gleichkommt. Das Integral des Peaks 3 in Abb. 19 entspricht mit einer Höhe von 147 einer Menge von 53 ng (erwartete Menge ~ 47 ng, entsprechend einer Integrationsfläche von 130).

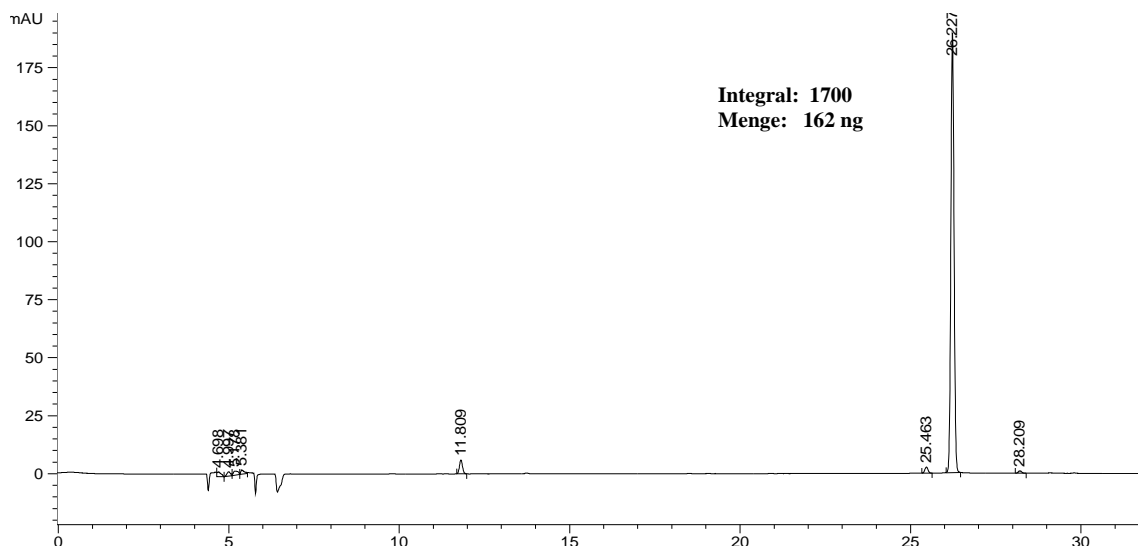


**Abbildung 19:** Co-Chromatographie von 20 ng authentischem Bisdesmethoxycurcumin mit einem Parallelansatz aus Abb. 17

Die Co-Chromatographie zeigt einen scharfen Peak für das Bisdesmethoxycurcumin mit einer entsprechenden Vergrößerung der Integrationsfläche. Auch die online-Spektren des Produktes der Inkubation und des Peaks 3 der Co-Chromatographie sind identisch mit dem der Referenzsubstanz.

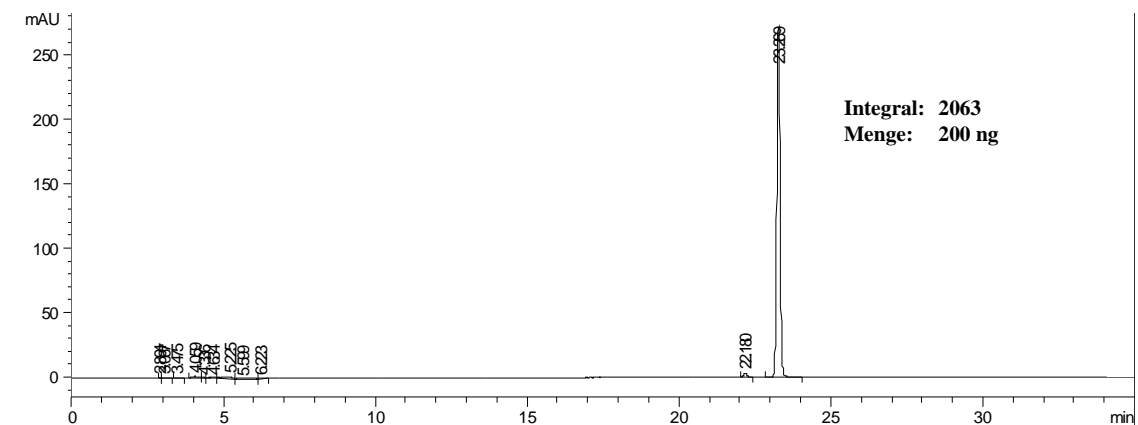
#### 4.1.1.2 Inkubationen mit Cinnamoyl-CoA

Neben 4-Cumaroyl-CoA wurde auch Cinnamoyl-CoA als Startersubstrat getestet. Im Chromatogramm der Inkubation (Abb. 20) wurde für das Hauptprodukt 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on eine Integrationsfläche von 1700 ermittelt. Über eine Eichgerade wurde auch hier die enzymatische Ausbeute der Inkubation berechnet und ergab eine Menge von 162 ng. Da das Produkt im obigen Gradienten spät eluiert wurde (Abb. 20), musste der Gradient verändert werden (s. 3.3.2.1).



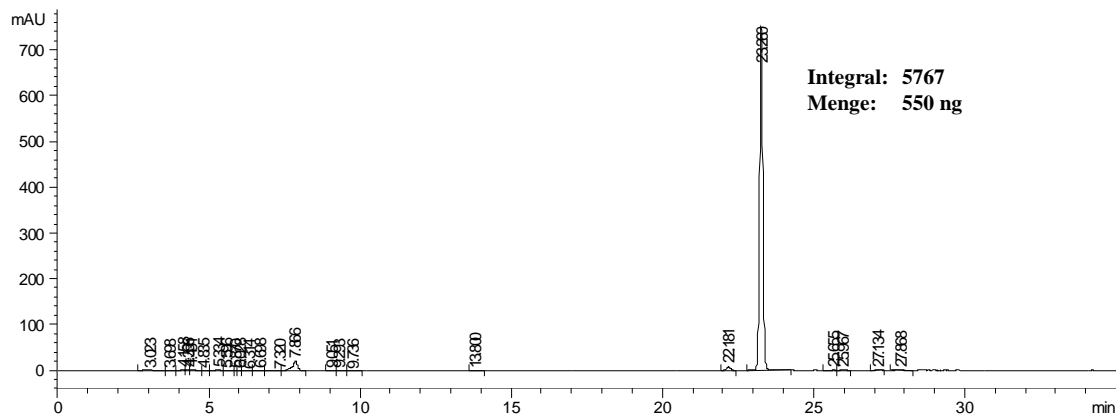
**Abbildung 20:** HPLC-Chromatogramm einer Inkubation mit Malonyl-CoA und Cinnamoyl-CoA vor Änderung des Gradienten (390 nm)

Die Abbildung 21 zeigt das Chromatogramm der Referenz 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on, die bei einer Retentionszeit von  $t_R = 23,2$  min eluiert wurde. Es wurden 200 ng der Referenz injiziert, die eine Integrationsfläche von 2063 aufwiesen.



**Abbildung 21:** HPLC-Chromatogramm der Referenz 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on nach Änderung des Gradienten (390 nm)

Für die Co-Chromatographie wurde einem Doppel der schon vermessenen Inkubation (Abb. 20) eine Menge von 400 ng der authentischen Referenz zugefügt (Abb. 22). Für den resultierenden Peak ergab sich eine Integrationsfläche von 5767. Die erwartete Fläche für eine ungefähre Menge von 562 ng (400 ng Referenz + 162 ng enzymatisches Produkt) entspräche 5826. Diese geringfügige Abweichung der Integrationsfläche kann durch leicht schwankende Ausbeuten in den Parallel-Inkubationen begründet werden.

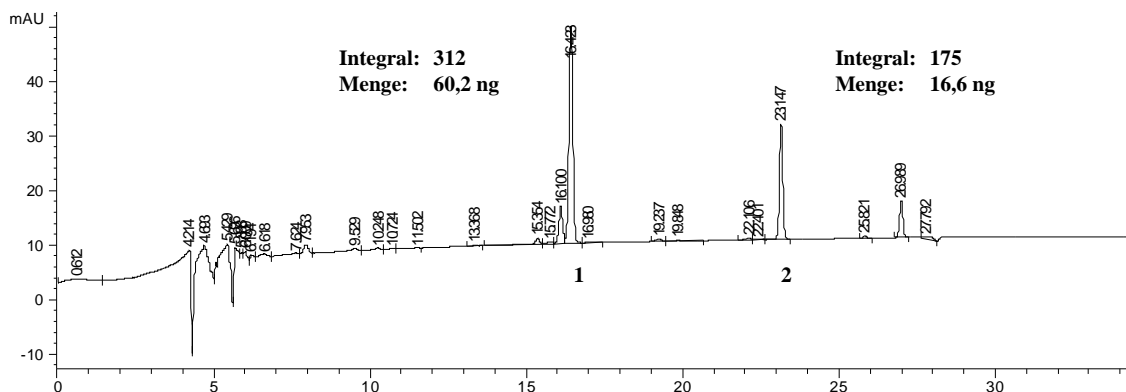


**Abbildung 22:** Co-Chromatographie des Produkts von Cinnamoyl-CoA mit 400 ng authentischer Referenz (390 nm)

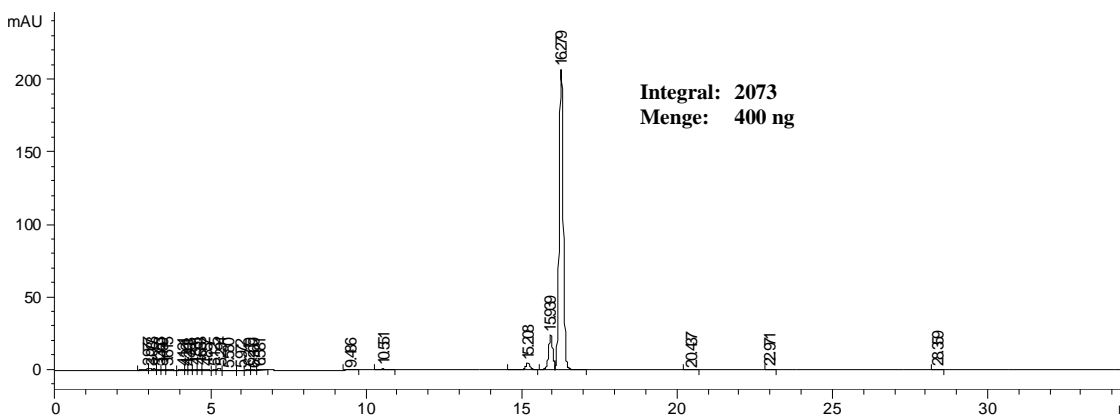
Auch bei diesen Chromatogrammen waren die online-Spektren der Peaks der Inkubation und der Co-Chromatographie identisch mit dem der Referenz. Außerdem wurde auch hier das enzymatische Produkt in der Gruppe von PD Dr. Schneider in Jena mit Hilfe der LC-MS eindeutig identifiziert.

#### 4.1.1.3 Inkubation mit Cinnamoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA

Als nächstes wurden die beiden Enzyme mit einer Mischung aus 4-Cumaroyl-CoA und Cinnamoyl-CoA inkubiert. Für die Versuche wurden beide Starter in Sättigung angeboten. Es wurde zum Einen das Produkt aus der Inkubation mit Cinnamoyl-CoA, 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on (Peak 2,  $t_R = 23,1$  min) gebildet, und zum Anderen das Diarylheptanoid mit nur einer Hydroxygruppe an den Phenylresten, das 5-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-1,4,6-trien-3-on (Peak 1,  $t_R = 16,2$  min) (Abb. 23). Das Chromatogramm der authentischen Referenzsubstanz zu letzterem Peak ist in Abb. 24 gezeigt. Das Bisdesmethoxycurcumin wurde in dieser Kombination der Startermoleküle jedoch nicht gebildet.



**Abbildung 23:** HPLC-Chromatogramm der Inkubation mit 4-Cumaroyl-CoA und Cinnamoyl-CoA



**Abbildung 24:** HPLC-Chromatogramm der Referenz 5-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-1,4,6-trien-3-on

Auch hier wurde eine Co-Chromatographie mit der von PD Dr. Schneider hergestellten Referenz durchgeführt, um die Bildung des 5-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-1,4,6-trien-3-on zu beweisen. Die online-Spektren des Produkts der Inkubation und des Peaks der Co-Chromatographie waren auch hier identisch mit dem der Referenz. Schließlich wurde die Identität des Produkts durch eine LC-MS Analyse im Labor der Arbeitsgruppe Schneider bestätigt.

#### 4.1.1.4 Inkubationen mit Diketidyl-NAC-Estern

Die Diketidyl-NAC-Ester von Zimtsäure, 4-Cumarsäure und Dihydrozimtsäure wurden im Labor von PD Dr. Schneider in Jena hergestellt, um damit die kinetischen Daten für das Enzym WtPKS2 zu bestimmen. Es wurde vermutet, dass die vorherige Bildung von Diketidyl-CoA durch das Enzym WtPKS1 notwendig ist, damit die WtPKS2 durch eine Verknüpfung des NAC-Esters mit 4-Cumaroyl-CoA die Diarylheptanoide aufbauen kann (Brand, 2005).

Zunächst wurden für die Inkubationen die Diketidyl-NAC-Ester in derselben Konzentration wie die CoA-Ester, also jeweils in Sättigung, aber ohne Malonyl-CoA eingesetzt. Auf diese Weise konnten keine enzymatischen Produkte detektiert werden. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen (Tab. 4.1 - 4.5) der NAC-Ester getestet, aber das Enzym WtPKS2 zeigte mit keinem der getesteten Diketidyl-NAC-Ester Aktivität. Die NAC-Ester sind gegenüber den CoA-Estern zwar deutlich stabiler, um aber dennoch sicher zu sein, dass sie noch funktionstüchtig waren, wurden sie einer Standardinkubation (3.3.1.1) mit einer Chalconsynthase (CHS aus *Sorbus aucuparia*) unterzogen. Mit diesem Enzym war es möglich, die erwarteten Produkte (Chalcone) zu detektieren und so sicherzustellen, dass die NAC-Ester von einer PKS akzeptiert werden und folglich funktionstüchtig waren. Die CHS war zuvor nach den Methoden 3.1.1 angezüchtet, nach 3.1.12 und 3.1.13 exprimiert und nach 3.2.1.1 gereinigt und umgepuffert worden (3.2.2).

Tab.4.1: Inkubationen mit variierenden Konzentrationen des Cinnamoyl-Diketidyl-NAC-Esters und Cinnamoyl-CoA

Cinnamoyl-Diketidyl-NAC [ $\mu\text{M}$ ]	Cinnamoyl-CoA
1.5	jeweils gesättigt (150 $\mu\text{M}$ ) und halbgesättigt (75 $\mu\text{M}$ )
3	
6	
12	
25	
50	
75	
100	
150	
300	
750	
1500	

Tab.4.2: Inkubationen mit variierenden Konzentrationen des 4-Cumaroyl-Diketidyl-NAC-Esters und 4-Cumaroyl-CoA

4-Cumaroyl-Diketidyl-NAC [ $\mu\text{M}$ ]	4-Cumaroyl-CoA
75	jeweils gesättigt (600 $\mu\text{M}$ ) und halbgesättigt (300 $\mu\text{M}$ )
150	
300	
600	
3000	

Tab.4.3: Inkubationen mit dem Cinnamoyl-Diketidyl-NAC-Ester und variierenden Konzentrationen an Cinnamoyl-CoA

Cinnamoyl-Diketidyl-NAC	Cinnamoyl-CoA [ $\mu\text{M}$ ]
jeweils 150 $\mu\text{M}$	25
	50
	100
	150

Tab.4.4: Inkubationen mit dem 4-Cumaroyl-Diketidyl-NAC-Ester und Cinnamoyl-CoA

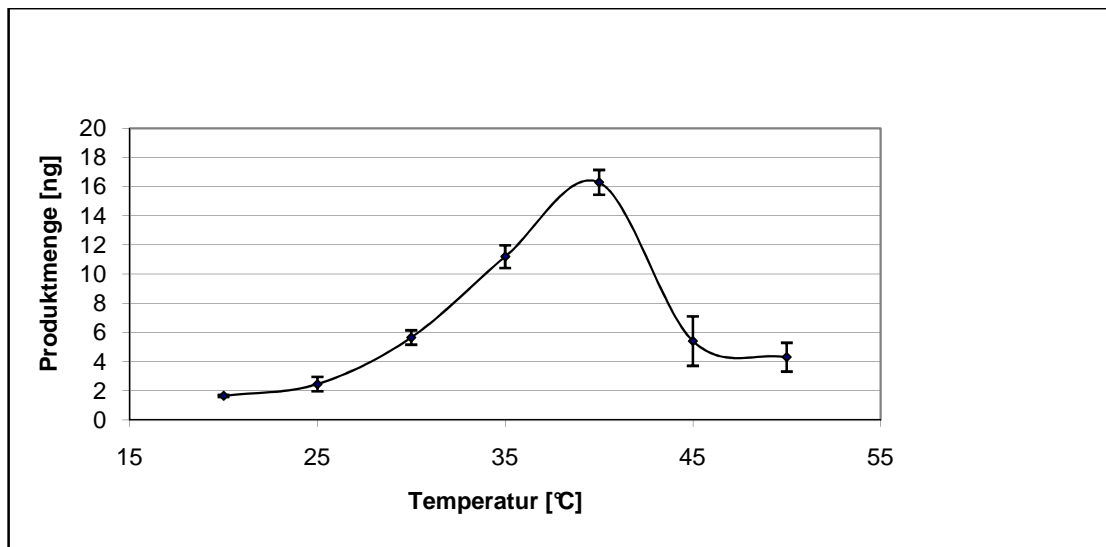
4-Cumaroyl-Diketidyl-NAC [ $\mu\text{M}$ ]	Cinnamoyl-CoA
300	jeweils gesättigt (150 $\mu\text{M}$ )
600	

Tab.4.5: Inkubationen mit dem Cinnamoyl-Diketidyl-NAC-Ester und 4-Cumaroyl-CoA

Cinnamoyl-Diketidyl-NAC [ $\mu\text{M}$ ]	4-Cumaroyl-CoA [ $\mu\text{M}$ ]
75	300
150	600

#### 4.1.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

Unter dem Temperaturoptimum einer enzymatischen Reaktion versteht man die Temperatur, bei der die katalysierte Reaktion am schnellsten abläuft. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt dabei auch eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bis zu dem Punkt, an dem die Proteine anfangen zu denaturieren. Das Temperaturoptimum für die untersuchte Reaktion wurde durch Inkubation nach 3.3.1 durch 20 min-Inkubation bei 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50°C durch Dreifachmessung bestimmt. Als Inkubationspuffer wurde 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 7,25 + 1 mM DTT) verwendet. Um Substrate zu sparen, wurde der Inkubationsansatz halbiert (3.3.1.3, Tab. 3.5). Das Temperaturoptimum für die Reaktion lag bei ~40°C (Abb. 25), woraufhin alle weiteren Inkubationen bei dieser Temperatur durchgeführt wurden.

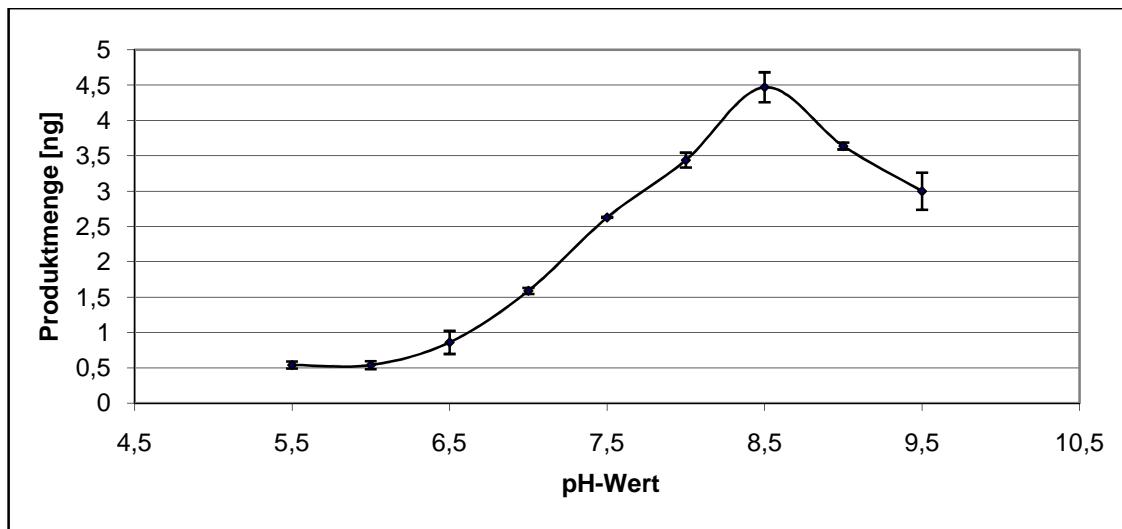


**Abbildung 23:** Bestimmung des Temperaturoptimums der WtPKS1/WtPKS2-katalysierten Reaktion

#### 4.1.3 Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum einer enzymatischen Reaktion weist auf den pH-Wert des Umgebungsmilieus des Proteins *in vivo* hin. Eine Änderung des pH-Wertes verändert auch die funktionellen Gruppen der Seitenketten eines Enzyms. Durch Protonierung oder Deprotonierung kann es zu Konformationsänderungen kommen, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen. Bei extremen pH-Werten kommt es zur Hydrolyse der Proteine und damit zur irreversiblen Denaturierung.

Das pH-Optimum für die Bildung des Diarylheptanoids durch die Enzyme WtPKS1 und WtPKS2 wurde in einer 20-minütigen Inkubation nach 3.3.1 bei 40°C durch Dreifachmessung bestimmt. Dazu wurde 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer + 1 mM DTT mit pH-Werten von 5,5 bis 9,5 verwendet (0,5-Einheiten-Schritte). Auch hier wurde der Inkubationsansatz halbiert, um Substrate zu sparen (3.3.1.3, Tab. 3.6). Das pH-Optimum der untersuchten Reaktion lag bei 8,5 (Abb. 26), woraufhin alle weiteren Inkubationen bei diesem pH-Wert durchgeführt wurden.



**Abbildung 24:** Bestimmung des pH-Optimums der WtPKS1/WtPKS2-katalysierten Reaktion

#### 4.1.4 Bestimmung kinetischer Parameter

Zu den kinetischen Parametern gehören die Substratspezifität ( $K_m$ ), die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ). Diese Werte wurden für alle drei Substrate in drei unabhängigen Versuchen bestimmt.

##### 4.1.4.1 Malonyl-CoA

Nach dem von Brand (2005) erstellten Reaktionsschema wird Malonyl-CoA von WtPKS1 genutzt, um das Startersubstrat zu verlängern. Auch im Ansatz mit beiden Enzymen ist Malonyl-CoA zwingend notwendig, um das Diarylheptanoid zu bilden. Für die Bestimmung des  $K_m$  wurde mit Malonyl-CoA-Konzentrationen von 25-600  $\mu\text{M}$  inkubiert, während Cumaroyl-CoA in Sättigung vorlag. Die Reaktion folgt der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 27). Zur genaueren Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wurden die Werte durch doppelt-reziproke Umformung in das Lineweaver-Burk Diagramm sowie in den Hanes-Plot umgerechnet (Abb. 28). Es ergab sich ein  $K_m$ -Wert von 97  $\mu\text{M}$  und ein  $k_{cat}$ -Wert von  $2,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , woraus sich für  $k_{cat}/K_m$  ein Wert von  $25,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  errechnen ließ.



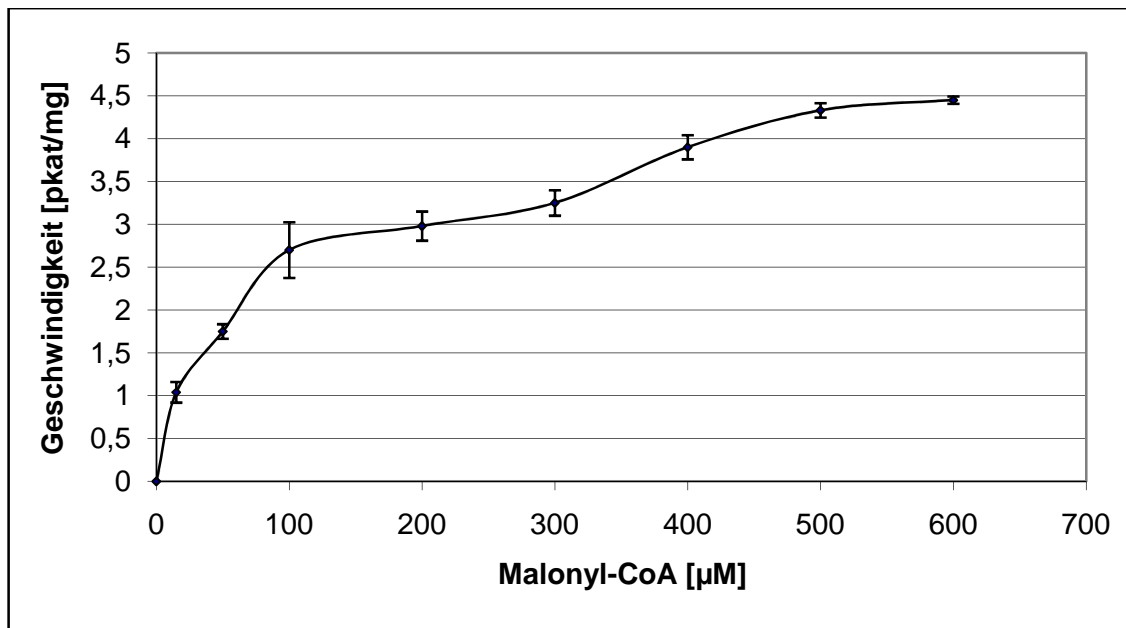


Abbildung 25: Michaelis-Menten-Diagramm für Malonyl-CoA

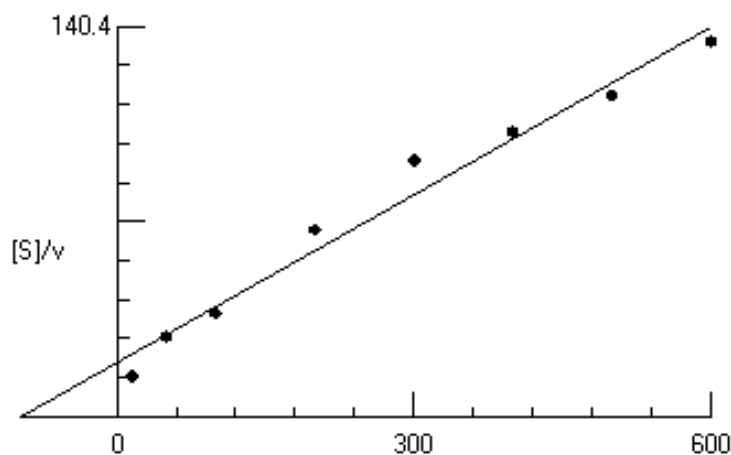


Abbildung 26: Abbildung des Hanes-Plots für Malonyl-CoA

#### 4.1.4.2 4-Cumaroyl-CoA

Die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für 4-Cumaroyl-CoA erfolgte durch Inkubationen nach 3.3.1.3 mit ansteigenden Konzentrationen von 4-Cumaroyl-CoA (12,5 - 800  $\mu\text{M}$ ), während Malonyl-CoA in Sättigung vorlag. Anhand des Kurvenverlaufes kann man erkennen, dass die Bildung des Bisdesmethoxycurcumins relativ langsam ansteigt und bei einer Konzentration von etwa 700  $\mu\text{M}$  Cumaroyl-CoA die Sättigung erreicht (Abb. 29, 30). Daraus ergab sich ein  $K_m$ -Wert von etwa 350  $\mu\text{M}$ . Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  wurde

auf  $2,5 \times 10^{-3}/s$  bestimmt, wodurch sich eine katalytische Effizienz von  $8,3 \text{ M}^{-1}s^{-1}$  errechnen ließ.

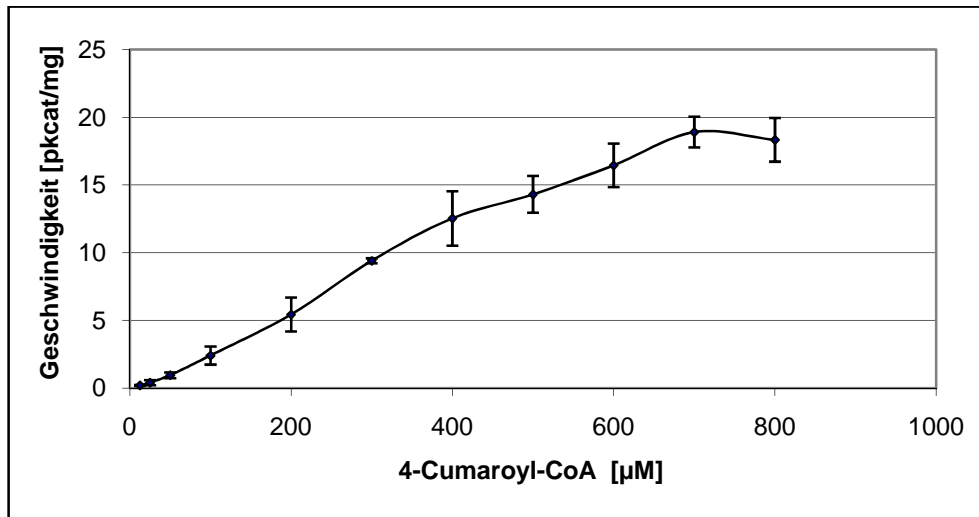


Abbildung 27: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration

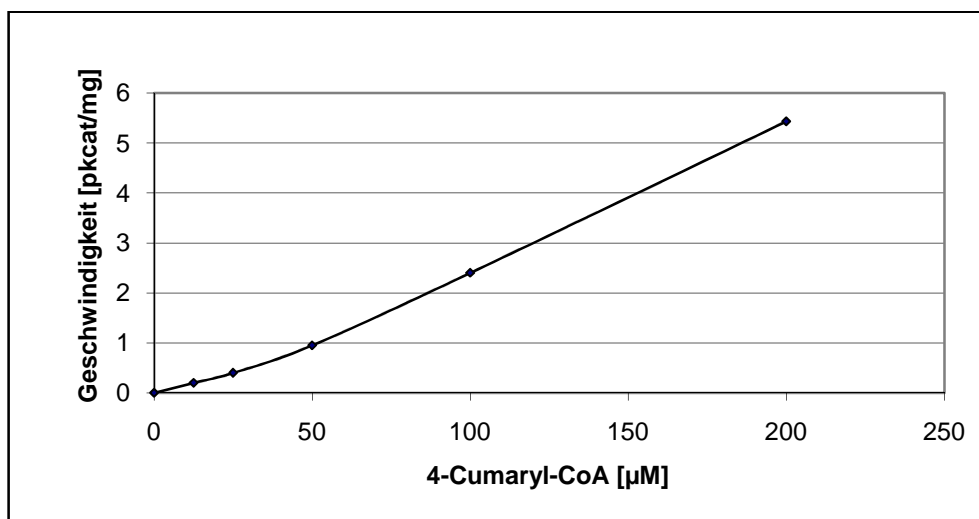


Abbildung 28: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration im Bereich 0-200  $\mu\text{M}$

#### 4.1.4.3 Cinnamoyl-CoA

Für das Enzym WtPKS1 war Cinnamoyl-CoA nach den Experimenten von Brand (2005) das weniger gute Startersubstrat. Hier konnte allerdings gezeigt werden, dass bei einer Inkubation mit beiden Enzymen mehr 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on gebildet wurde, als bei der Inkubation mit 4-Cumaroyl-CoA an Bisdesmethoxycurcumin. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden auch hier steigende Konzentrationen an Startersubstrat gegen die Reaktionsgeschwindigkeit der Diarylhep-

tanoid-Bildung aufgetragen (Abb. 31). Es ergab sich ein sigmoider Kurvenverlauf. Wenn man die halbmaximale Geschwindigkeit für die Bestimmung von  $K_m$  zugrundelegt, dann folgt daraus hier ein  $K_m$  von etwa  $75 \mu\text{M}$ . Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  wurde mit  $1,78 \times 10^{-3}/\text{s}$  und die katalytische Effizienz mit einem  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Wert von  $23,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  berechnet.

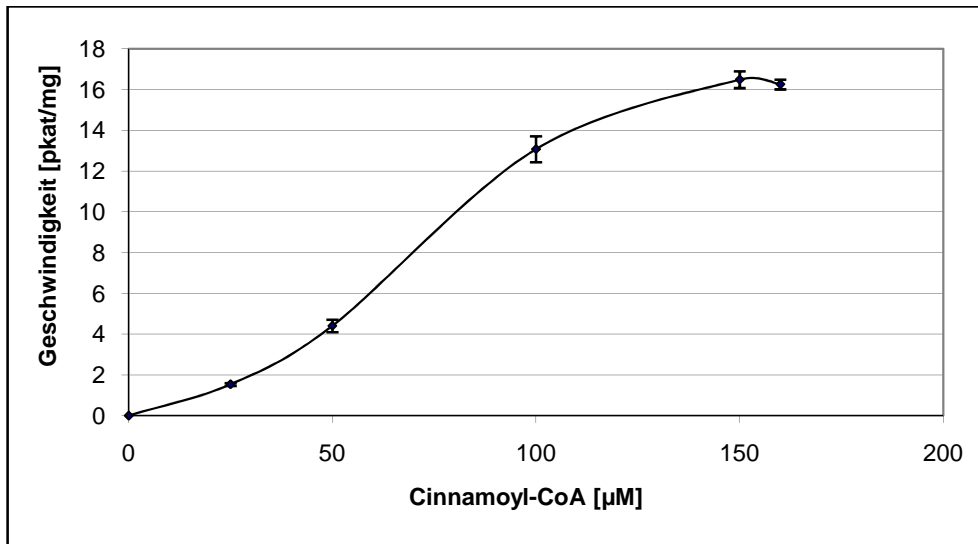


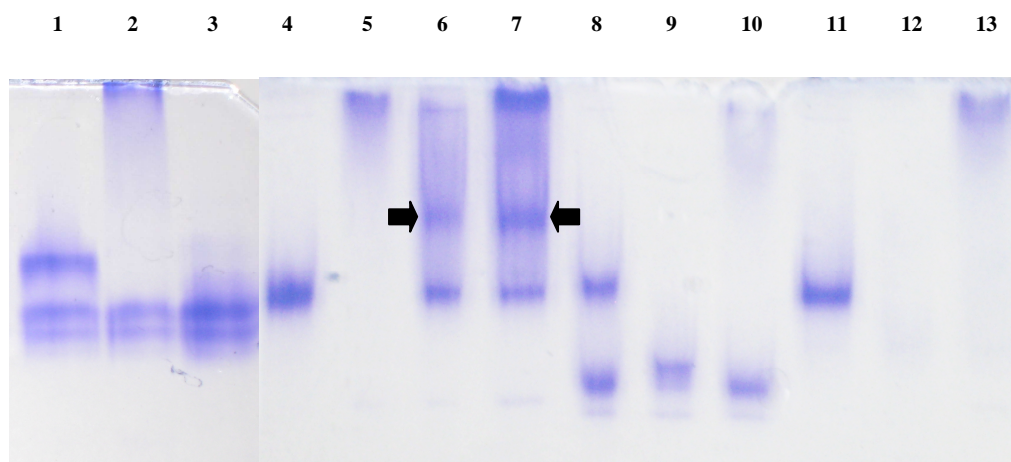
Abbildung 29: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Cinnamoyl-CoA-Konzentration

#### 4.1.5 Verhalten von PKS in nicht-denaturierenden Proteingelen

Um eine Komplexbildung von WtPKS1 und WtPKS2 zu prüfen, wurden native Proteingele durchgeführt. Hier werden die Proteine nicht denaturiert, wodurch es möglich ist, PKS als Homodimere zu detektieren. Es wurde ein basisches Gel gegossen, da der isoelektrische Punkt von PKS im Allgemeinen im leicht sauren bis neutralen Bereich liegt. In diesem Gel wurden verschiedene Proteine sowohl einzeln als auch in Mischung mit WtPKS1 oder WtPKS2 aufgetragen. Verwendet wurden die Biphenylsynthase (BIS1 aus *Sorbus aucuparia*), die Benzophenonsynthase (BPS aus *Hypericum androsaemum*) und die Chalconsynthase (CHS aus *Sorbus aucuparia*).

Durch die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der Enzyme war es möglich, eine Auftrennung der Mischungen trotz identischer Molekülmassen zu erhalten (Abb. 32). Der pI der WtPKS2 liegt bei 7, daher ist dieses Enzym nicht über den Startpunkt hinaus ins Gel gewandert. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen der Enzyme. Die CHS ist leider nicht gut zuerkennen, bei direkter Aufsicht war alledings eine schwache Ban-

de auszumachen. Auffallend war, dass nur bei der Kombination WtPKS1 und WtPKS2 zusätzlich zu den Einzelbanden der Enzyme eine weitere Bande detektiert wurde, die zwischen denen der Einzelbanden lokalisiert war (s. Pfeile in Spuren 6 und 7 der Abb. 32). Dies spricht für eine Komplexbildung der beiden Homodimere, die erklären könnte, warum es nicht möglich ist, die Diketidyl-NAC-Ester von außen in die Enzyme einzufüttern, um die Diarylheptanoide zu bilden. Allerdings müssen hierzu noch detaillierte Untersuchungen folgen.



**Abbildung 30:** Natives Gel mit unterschiedlichen Polyketidsynthasen und ihren Mischungen **1**, BPS und WtPKS1; **2**, BPS und WtPKS2; **3**, BPS allein; **4**, WtPKS1 allein; **5**, WtPKS2 allein; **6**, WtPKS1 und WtPKS2; **7**, WtPKS1 und WtPKS2 in doppelter Konzentration; **8**, WtPKS1 und BIS1; **9**, BIS1 allein; **10**, BIS1 und WtPKS2; **11**, WtPKS1 und CHS; **12**, CHS allein; **13**, CHS und WtPKS2

## 4.2 Kristallisierung

### 4.2.1 Expression der Biphenylsynthase

Die verwendete Biphenylsynthase aus *Sorbus aucuparia* (BIS1) wurde bereits von Raeth (2007) charakterisiert und vorläufig kristallisiert. Da die Struktur des aktiven Zentrums in dieser Arbeit nicht eindeutig aufgeklärt werden konnte, wurde das Projekt erneut aufgegriffen. Das modifizierte Trypsin, welches in der früheren Arbeit zum Abschneiden des His<sub>6</sub>-Restes verwendet wurde, stand nicht mehr zur Verfügung. Daher musste eine andere Methode gefunden werden, um das Tag zu entfernen und das Enzym in der erforderlichen Menge und Reinheit zu gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die BIS1 in Form unterschiedlicher Konstrukte zu kristallisieren. Dazu wurden verschiedene Expressionsvektoren verwendet.

#### 4.2.1.1 Expression im Vektor pET28c

Der erste Versuch bestand darin, das His<sub>6</sub>-Tag der BIS1 mit Thrombin zu entfernen. Dazu wurde die BIS1 mit den Restriktionsenzymen NheI und BamHI (Primer Sa5BIS1 und Sa3BIS1; 2.1.8) in den Vektor pET28c der Firma Novagen kloniert (Abb. 33), da dieses Plasmid eine Schnittstelle für Thrombin besitzt, die in Leserichtung hinter dem His<sub>6</sub>-Tag liegt. Die Unterschiede zwischen dem dargestellten Vector (pET28a) und dem verwendeten Vector (pET28c) sind in Abb. 34 dargestellt. Nach dem Schneiden gemäß 3.2.9.1 lagen demnach nur noch die vier Aminosäuren Gly, Ser, His, und Met vor der Sequenz der BIS1. Nach Transformation in die BL21-Wirtszellen (3.1.10) konnte das Protein durch Zugabe von IPTG exprimiert werden (3.1.12). Für die Kristallisierung wurden für einen einzelnen Ansatz die Zellen aus insgesamt 7,2 Litern LB-Medium (18 x 400 ml) verwendet. Bei optimalen Bedingungen ergab sich daraus eine Proteinausbeute von ca. 30 mg.

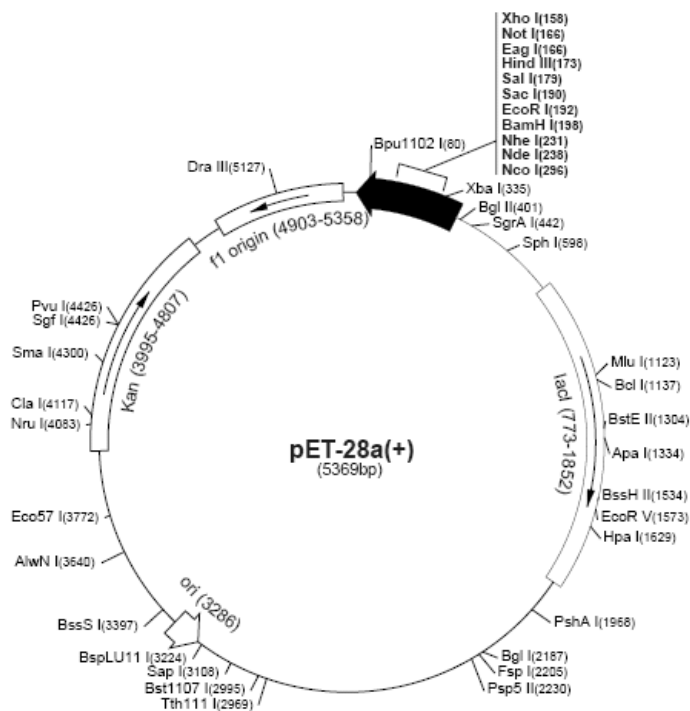


Abbildung 31: Vektormappe des Expressionsvektors pET28c



Abbildung 32: Unterschiede in den Expressionsvektoren pET 28 a, b und c

#### 4.2.1.2 Expression im Vektor pRsetB

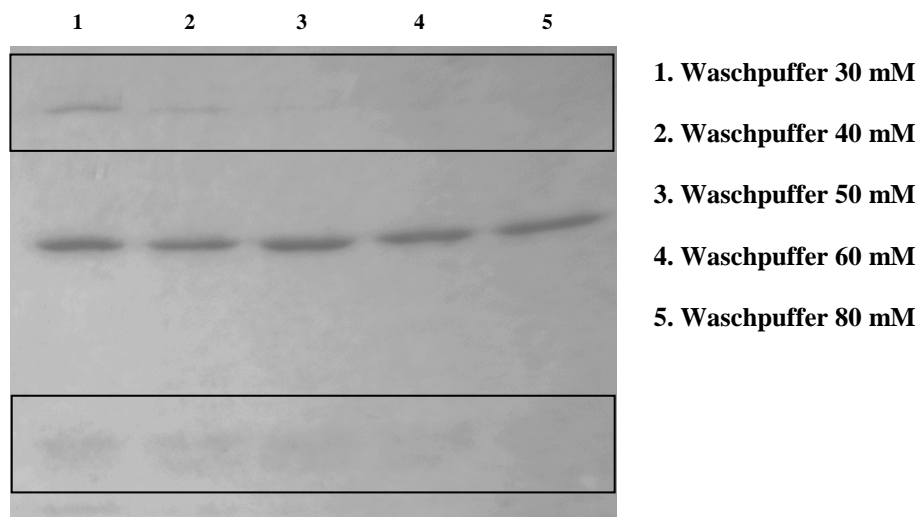
Eine weitere Möglichkeit, das His<sub>6</sub>-Tag zu entfernen, bot das Schneiden mit TEV (*Tobacco-Etch-Virus*). Dazu musste die Biphenylsynthase jedoch mit der Sequenz für die TEV-Schnittstelle erneut kloniert werden. Da die Expression im Vektor pRsetB etwas höhere Proteinausbeuten lieferte als in pET28c, wurde dieser als Expressionsvektor gewählt. Die BIS1 wurde mit den Primern 5SaBIS1Nhe1TEV (sense) und 3ExpBPSHC (antisense) (2.1.8) und den Restriktionsenzymen Nhe1 und KpN1 nach 3.1.6 und 3.1.9 in den Vektor pRsetB kloniert. Durch das Schneiden mit der TEV-Protease konnten alle Aminosäuren, die vor dem Protein lagen, bis auf das letzte Glycin entfernt werden. Nach Transformation in die BL21-Wirtszellen (3.1.10) konnte die BIS1 durch Zugabe von IPTG nach 3.1.12 exprimiert werden. Auf diese Weise wurden bis zu 45 mg gereinigtes Protein aus einem einzigen Ansatz mit 7,2 Litern LB-Medium gewonnen.

Ein weiterer Versuch, die BIS1 zu kristallisieren, bestand in der Herstellung eines verkürzten Konstruktes des Proteins. Dazu wurde der N-terminale, ungeordnete Bereich des Proteins analog zur bereits kristallisierten Chalconsynthase aus *Medicago sativa* abgetrennt. Der entfernte Bereich entsprach den ersten 13 Aminosäuren der publizierten BIS1-Sequenz. Hierzu wurde der forward-Primer 5SaBIS TEV verwendet. Der reverse-Primer blieb unverändert (3ExpBPSHC). Klonierung und Expression erfolgten wie in 4.2.1.1 beschrieben.

## 4.2.2 Aufreinigung der BIS

### 4.2.2.1 Reinigung über Ni-NTA-Agarose

Da die Polyketidsynthase BIS1 in den jeweiligen Expressionsvektoren mit einem His<sub>6</sub>-Tag exprimiert wurde, konnte sie mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose leicht von den *E. coli*-eigenen Proteinen abgetrennt werden. Nach der Lyse der Zellen gemäß 3.1.11 erfolgte die Aufreinigung nach 3.2.1.1. Für den Waschpuffer wurde eine Imidazol-Konzentration von 80 mM ausgewählt, da bei dieser Konzentration das Verhältnis zwischen der Reinheit des Zielproteins und dessen Verlust optimal erschien (Abb. 35). Für die Elution wurde ein 250 mM Imidazolpuffer gewählt.



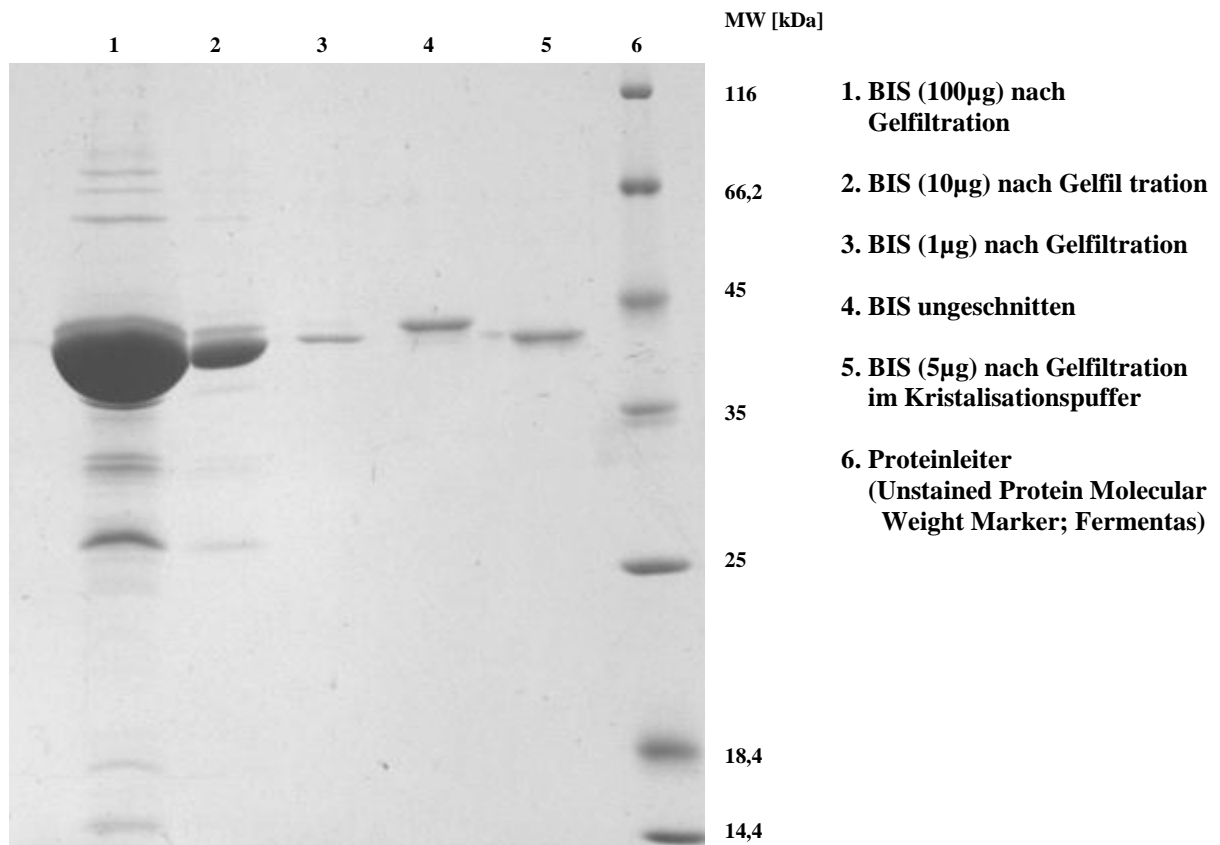
**Abbildung 33:** SDS-Polyacrylamidgel zum Testen von verschiedenen Waschpufferkonzentrationen. In den Rechtecken sind Banden von Fremdproteinen zu sehen.

### 4.2.2.2 Schneiden des His<sub>6</sub>-Tags mit Thrombin

Nach erfolgter Reinigung über Ni-NTA-Agarose (3.2.1.1) wurde zunächst Thrombin (restriction grade) zum Entfernen des His<sub>6</sub>-tags eingesetzt (Abb. 36). Nach dem Schneiden wurde der ungeschnittene Proteinanteil und das abgespaltene Tag aus dem Ansatz über erneute Kopplung an Ni-NTA entfernt. Die vollständige Elution des geschnittenen Proteins erfolgte mit Waschpuffer. Um das Thrombin aus dem Ansatz zu entfernen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt (3.2.10), wonach das Protein in Tris-HCl Kristallisationspuffer (2.1.3) umgepuffert und dann einkonzentriert wurde.

Da es nach dieser Methode nicht möglich war, Proteinkristalle zu züchten, wurde beschlossen, das Thrombin mit Streptavidin-Agarose aus dem Ansatz zu entfernen. Dazu wurde biotinyliertes Thrombin (Novagen) eingesetzt, welches nach dem Schneiden

(3.2.9.1) gemäß 3.2.1.2 an die Streptavidin-Agarose gebunden wurde. Die Proteinfraction wurde über PD10 Säulen abgetrennt, umgepuffert (3.2.2) und einkonzentriert (3.2.7).

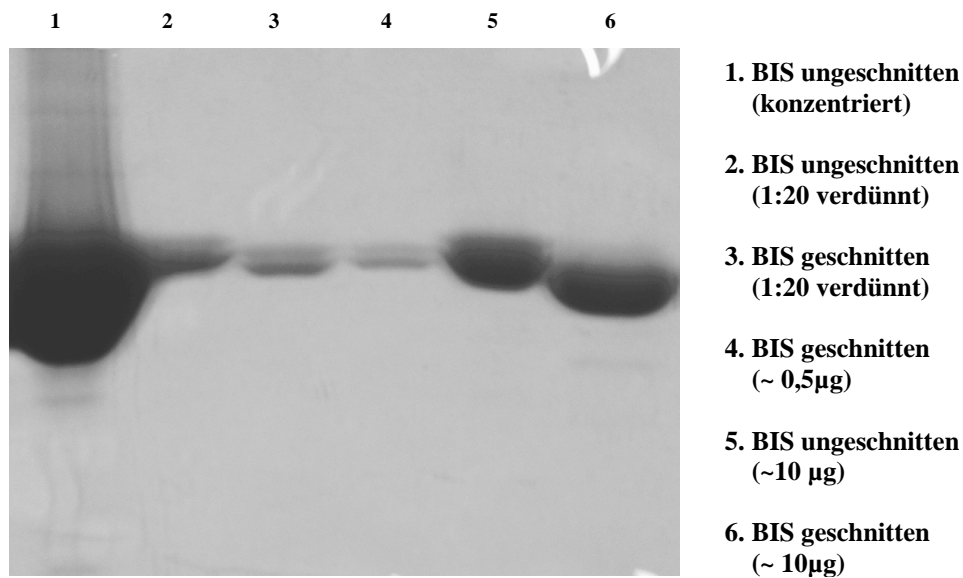


**Abbildung 34:** SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Reinheit von BIS1

#### 4.2.2.3 Schneiden des His<sub>6</sub>-Tags mit TEV-Protease

Das Schneiden mit der TEV-Protease hatte den Vorteil, dass dieses Enzym selber herzustellen war. Anfänglich wurde eine Leihgabe der Arbeitsgruppe Prof. Stubbs, Universität Halle-Wittenberg verwendet, da die Konzentration der eigenen Herstellung für die zu spaltende Proteinmenge nicht ausreichte. Damit konnte das Schneiden bei 4°C schonend für das Zielprotein durchgeführt werden. Die TEV-Protease schneidet nahezu direkt vor dem Zielprotein, es verbleibt nur ein zusätzlicher Glycin-Rest. Im SDS-Polyacrylamidgel konnte man sehen, dass das Schneiden vollständig verlief (Abb. 37).



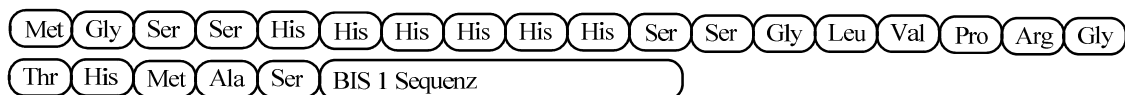


**Abbildung 35:** SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle des Schneidens mit TEV-Protease

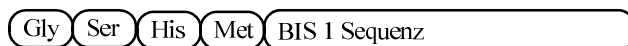
#### 4.2.3 Kristallisierung der Biphenylsynthase

Im Rahmen dieser Arbeit wurden viele verschiedene Versuche unternommen, die BIS1 zu kristallisieren. Dabei wurden nicht nur unterschiedliche Konstrukte des Proteins verwendet, sondern es kamen auch unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Folgende Konstrukte wurden hergestellt und nach Aufreinigung für die verschiedenen Versuche eingesetzt (Abb. 38).

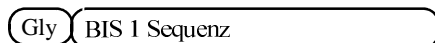
**A:** BIS1 mit Überhang geschnitten



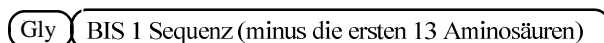
**B:** BIS1 geschnitten mit Thrombin



**C:** BIS1 geschnitten mit TEV-Protease



**D:** BIS1 geschnitten mit TEV-Protease und zusätzlich um die ersten 13 Aminosäuren verkürzt



**Abbildung 36:** Für Kristallisationsversuche verwendete Konstrukte von BIS1 mit N-terminalem Überhang

#### 4.2.3.1 Kristallisierung von Thrombin-geschnittener BIS1

Da in den vorherigen Experimenten von Raeth (2007) bereits Kristalle gezüchtet werden konnten, sollte versucht werden dies zu reproduzieren. Das mit Thrombin geschnittene Konstrukt unterschied sich unwesentlich von dem in seiner Arbeit verwendeten BIS1-Konstrukt. Die nach den Angaben von Raeth (2007) optimale Pufferbedingung wurde beibehalten (20% PEG 8000, 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 5,5). Unter dieser Bedingung wurden jeweils zwei Tropfen nach der „hanging drop“ Methode mit Proteinlösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,75) und Reservoir-Puffer in folgenden Verhältnissen angesetzt (Tab. 4.8).

Tab.4.8: Pipettierschema (Proteinlösung : Pufferlösung)

2,5µl : 2,5µl	2,4µl : 2,6µl	2,3µl : 2,7µl	2,2µl : 2,8µl	2,1µl : 2,9µl	2,0µl : 3,0µl
2,6µl : 2,4µl	2,7µl : 2,3µl	2,8µl : 2,2µl	2,9µl : 2,1µl	3,0µl : 2,0µl	3,1µl : 1,9µl

Die leichten Variationen in den Konzentrationen sorgten für leicht unterschiedliche pH-Werte und Salzkonzentrationen, die Auswirkungen auf die Kristallform und Größe haben können. Die fertigen Kristallisationsplatten wurden bei 13°C gelagert. Bei diesen Bedingungen kam es lediglich zur Bildung sehr kleiner Kristalle, so dass nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob es sich um Protein- oder Salzkristalle handelte. Daher wurde beschlossen, ein Fine-Screening mit Additiva-Zusatz durchzuführen.

##### 4.2.3.1.1 Fine-Screening mit Additiva

Für diese Versuche wurde ebenfalls die Reservoirpuffer-Bedingung gewählt, die bei Raeth (2007) zur Kristallbildung geführt hatte (20% PEG 8000, 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 5,5). Die verwendete Proteinlösung hatte Konzentrationen von 15 mg/ml und ~30 mg/ml (in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,75). Die Tropfen bestanden aus jeweils 2 µl der Proteinlösung, 2 µl des Reservoirpuffers und 0,1 µl Additiva-Lösung. Es wurden die Additiva-Kits der Firmen Sigma und Hampton Research verwendet. Die Kristallisationsplatten wurden ebenfalls bei 13°C gelagert.

Auch unter diesen Bedingungen waren die gebildeten Kristalle viel zu klein, um sie eindeutig identifizieren zu können. Daher wurde beim nächsten Ansatz die Temperatur verringert.

#### 4.2.3.1.2 Kristallisierung bei verringerter Temperatur

Für diesen Ansatz wurde sowohl die Pufferbedingung gewählt, die bei Raeth (2007) optimal war (Puffer 1) als auch eine weitere Bedingung, bei der ebenfalls Kristallwachstum beobachtet wurde. Nach dem folgenden Pipettierschema wurden wiederum jeweils zwei Tropfen mit unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (17 mg/ml und 34 mg/ml) (Tab. 4.9).

Tab.4.9: Pipettierschema für die Kristallisation bei verringerter Temperatur

2,5µl : 2,5µl	2,3µl : 2,7µl	2,1µl : 2,9µl	1,9µl : 3,1µl	1,7µl : 3,3µl	1,5µl : 3,5µl
2,5µl : 2,5µl	2,7µl : 2,3µl	2,9µl : 2,1µl	3,1µl : 1,9µl	3,3µl : 1,7µl	3,5µl : 1,5µl

Puffer 1: 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20% PEG 8000, pH 5,7

Puffer 2: 0,1 M HEPES, 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% PEG 400, pH 7,5

Die Platte wurde im Kühlraum bei 8°C gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen auf Kristallbildung geprüft. Da es auch bei diesen Ansätzen nicht zur gewünschten Kristallbildung kam, wurde beschlossen auf das Roboter-Screening nach der „sitting drop“ Methode zurückzugreifen. Es wurde vermutet, dass sich die Kristallisationsbedingungen durch die geringfügige Veränderung des Konstruktes aufgrund des Schneidens mit Thrombin geändert hatten.

#### 4.2.3.1.3 Roboter-Screening nach der „sitting drop“ Methode

Um möglichst viele verschiedene Pufferbedingungen testen zu können, wurde auf die „sitting drop“ Methode zurückgegriffen. Es wurde eine Proteinlösung von 7 mg/ml verwendet und mit folgenden Kristallisationspuffern getestet (Tab. 4.10).

Tab.4.10: Tabelle der verwendeten Kristallisationskits

Name des Kits	Firma
JBScreen classic 1-10	Jena Bioscience
JBScreen JCSG ++ 1-4	
Sigma basic	Sigma
Sigma cryo	
Sigma low ionic	
Sigma membrane proteins	
Sigma extenstion	
House factorials	Inst. Für Physikal. Biochemie Halle
Molecular Dimensions Morpheus	Molecular Dimensions

Die Platten wurden bei 13°C gelagert. Bei einigen Bedingungen bildeten sich kleine Kristalle, von denen sich die meisten als Salzkristalle entpuppten. Bei einer Bedingung aber wurden kleine Proteinkristalle gebildet (2,4 M Na-Melonat pH 7,0 / JBScreen JCSG ++ 3, Vial D3)

Diese Bedingung wurde zusätzlich für ein Fine-Screening mit variierenden Pufferkonzentrationen ausgewählt und für die Kapillarkristallisierung verwendet.

#### 4.2.3.1.4 pH-Screening

Durch ein Fine-Screening mit unterschiedlichen pH-Werten sollten die Bedingungen optimiert werden. Es wurde die Pufferbedingung gewählt, bei der sich im Roboter-Screening Kristalle gebildet hatten (2,4 M Na-Melonat pH 7,0 / JBScreen JCSG ++ 3, Vial D3). Dazu wurden jeweils zwei Tropfen nach folgendem Pipettierschema angesetzt, wobei die Proteinlösung in den Konzentrationen 8,5 und 17 mg/ml verwendet wurde (Tab. 4.11).

Tab.4.11: Pipettierschema für das pH-Screening (Proteinlösung: Pufferlösung)

pH 6,5	pH 6,8	pH 7,0	pH 7,2	pH 7,5
2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl
2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl	2,5 µl : 2,5 µl
2,0 µl : 1,0 µl	2,0 µl : 1,0 µl	2,0 µl : 1,0 µl	2,0 µl : 1,0 µl	2,0 µl : 1,0 µl
1,0 µl : 2,0 µl	1,0 µl : 2,0 µl	1,0 µl : 2,0 µl	1,0 µl : 2,0 µl	1,0 µl : 2,0 µl

#### 4.2.3.1.5 Kapillarkristallisierung

Für die Kapillarkristallisierung wurde die Bedingung ausgewählt, bei der im Roboter-Screening Kristalle gefunden wurden (2,4 M Na-Melonat pH 7,0 / JBScreen JCSG ++ 3, Vial D3). Es wurden jeweils Kapillaren mit dem Durchmesser 0,1 mm, 0,2 mm und 0,3 mm mit den Proteinlösung-Konzentrationen 8,5 mg/ml und 17 mg/ml gefüllt. Auch in der Kapillare konnte keine Kristallbildung erreicht werden.

#### 4.2.3.2 Kristallisierung von ungeschnittener BIS

Nachdem es nicht möglich war, mit dem Thrombin-geschnittenen Protein Kristalle zu züchten, wurde beschlossen es noch einmal mit ungeschnittenem Protein zu versuchen, wobei aber die Konzentration im Vergleich zu der Arbeit von Raeth (2007) in etwa verdoppelt wurde. Die Proteinkonzentration betrug 27 mg/ml. Auch mit dieser Konzentration wurden die 9 Platten (Tab. 4.10) angesetzt und bei 13°C gelagert. Bei diesem

Ansatz wurden die Platten mit einer für UV-Licht durchlässigen Folie verschlossen und in ein Imager-System platziert. Dieses nahm selbstständig in regelmäßigen Zeitabständen Bilder auf, welche man online abrufen konnte (Website: 141.48.19.158, Benutzername: Ag Beerhues, Passwort: agb).

Auch bei diesem Ansatz kam es aber nicht zur gewünschten Kristallbildung.

#### 4.2.3.3 Kristallisierung von TEV-geschnittener BIS

In einem weiteren Ansatz wurde die BIS1 mit TEV-Protease nach 3.2.9.2 geschnitten. Da sich das Konstrukt dadurch änderte, wurde wieder mit einem Roboter-Screening begonnen.

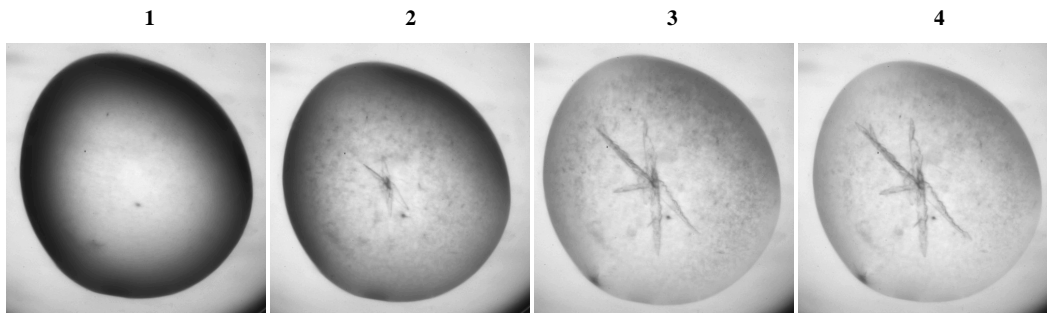
##### 4.2.3.3.1 Roboter-Screening

Für das Roboter-Screening wurden die Kristallisationskits der folgenden Firmen verwendet (Tab. 4.12).

Tab.4.12: Verwendete Kristallisationskits

Name des Kits	Firma
JBScreen classic 1-10	Jena Bioscience
JBScreen JCSG ++ 1-4	
Sigma basic	Sigma
Sigma cryo	
Sigma low ionic	
Sigma membrane proteins	
Sigma extenstion	
House factorials	Inst. Für Physikal. Biochemie Halle
Molecular Dimensions Morpheus	Molecular Dimensions

Die Konzentration der Proteinlösung betrug 15 mg/ml und 30 mg/ml. Auf den Platten kam es bei einigen Bedingungen zur Bildung von Proteinkristallen. Da die Platten auch in diesem Ansatz mit UV-durchlässiger Folie verschlossen wurden, war es möglich, die im UV-Licht hell aufleuchtendem Proteinkristalle von den Salzkristallen zu unterscheiden (Abb. 39). Außerdem konnte man über die ersten Tage ein Wachstum der Kristalle beobachten.



**Abbildung 37:** Kristallbilder der BIS1 nach der „sitting drop“ Methode, **1**, nach einigen Minuten; **2**, nach 12 Stunden; **3**, nach 2 Tagen; **4**, nach 4 Wochen

Kristallisationspuffer : 0,1 M Na-Citrat pH 5,6; 20% 2-Propanol ; 20% PEG 4000

Auf der Platte MC333 (Hampton Research Crystal Screen, Nr. 40) wuchs ein Kristall, der durch Röntgenbeugungsanalyse in der AG Stubbs, Universität Halle Wittenberg, vermessen wurde. Leider war der gemessene Datensatz nicht für eine Auswertung geeignet. Zudem wurde der Kristall durch die Messung so weit zerstört, dass er nicht für weitere Messungen (Synchrotron, Berlin) zur Verfügung stand. Basierend auf diesem Ergebnis wurden aber einige Bedingungen ausgewählt, um ein Fine-Screening mit der „hanging drop“ Methode durchzuführen.

#### 4.2.3.3.2 Kristallisation nach der „hanging drop“ Methode

Mit Hilfe der „hanging drop“ Methode wurde versucht, die Ergebnisse aus dem Roboter-Screening zu reproduzieren, mit der Erwartung, dass die Kristalle aufgrund des höheren Tropfenvolumens größer ausfallen würden. In der Tabelle 4.13 sind die für dieses Experiment getesteten Pufferbedingungen aufgeführt. Die verwendeten Proteinlösungen hatten eine Konzentration von 10 mg/ml und 20 mg/ml, da sich diese geringere Konzentration im Vergleich mit der ebenfalls verwendeten Konzentration von 30 mg/ml als vorteilhafter herausgestellt hatte.

Es wurden Tropfen mit 3 µl Volumen angesetzt, wobei das Verhältnis von Proteinlösung zu Reservoirpuffer für beide Konzentrationen 1,5 : 1,5 (jeweils zweimal angesetzt), 1 : 2 und 2 : 1 betrug. Die Kristalle, die auf diese Weise erhalten wurden (Abb. 40), waren zwar auch relativ flach, aber deutlich größer als die, die mit dem Roboter erzeugt wurden.

Tab.4.13: Pufferbedingungen mit Kristallbildung

Zusammensetzung	Kristallisations-Kit	Bedingung	Bildnummer
25% PEG 2000	Jena Bioscience JBScreen classic1	D3	1
10 mM MgCl <sub>2</sub> 10% PEG 6000	Jena Bioscience JBScreen classic 4	A4	2
0,1 M MES pH 6,5 12% PEG 20000	Hampton Research Crystal Screen 2	Nr. 22	3
0,1 M Na-Citrat pH 5,6 20% 2-Propanol 20% PEG 4000	Hampton Research Crystal Screen 1	Nr. 40	4
0,12 M Ethylenglycol 0,1 M Puffer 1 pH 6,5 12,5% MPD 12,5% PEG 1000 12,5% PEG 3350	Molecular Dimensions Morpheus	Nr.4	5
0,1 M Na-Citrat pH 6,4 0,2 M (NH <sub>4</sub> )-Acetat 30% PEG 4000 0,02 M NaN <sub>3</sub>	House factorials	Nr. 53	6

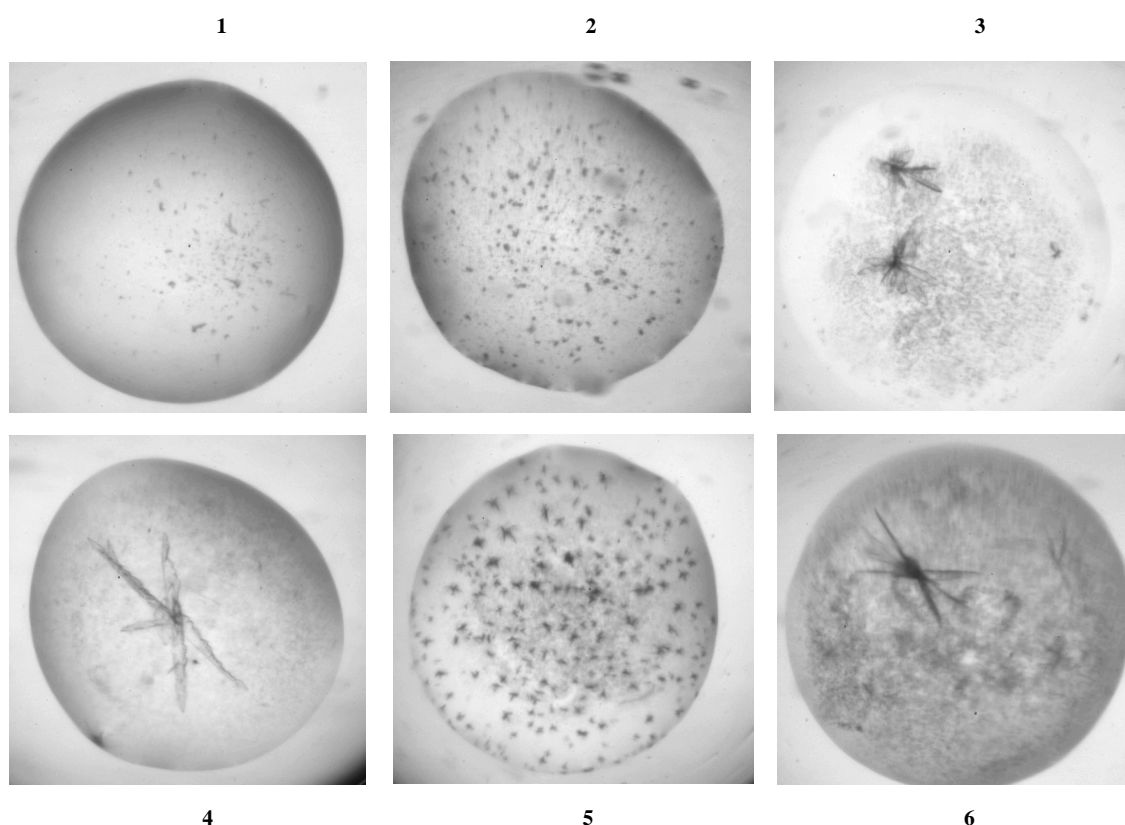


Abbildung 38: Kristallbilder (Zuordnung s. Tab .4.13)

#### 4.2.3.3.3 pH-Screening

Eine weitere Verbesserung der Kristalle sollte durch ein pH-Screening erreicht werden. Hierbei wurden pH-Werte von + und – 0,2 Einheiten um die ursprüngliche Bedingung getestet. Verwendet wurden dafür die gleichen Proteinlösungen (10 und 20 mg/ml), die für die zuvor nach der „hanging drop“ Methode angesetzten Bedingungen verwendet wurden, und ebenso die gleichen Pufferbedingungen wie oben angegeben. Die Kristallbildung war reproduzierbar. Leider gab es aber keine weiteren Informationen zu den Ergebnissen, da die Kooperation an diesem Punkt erlosch.

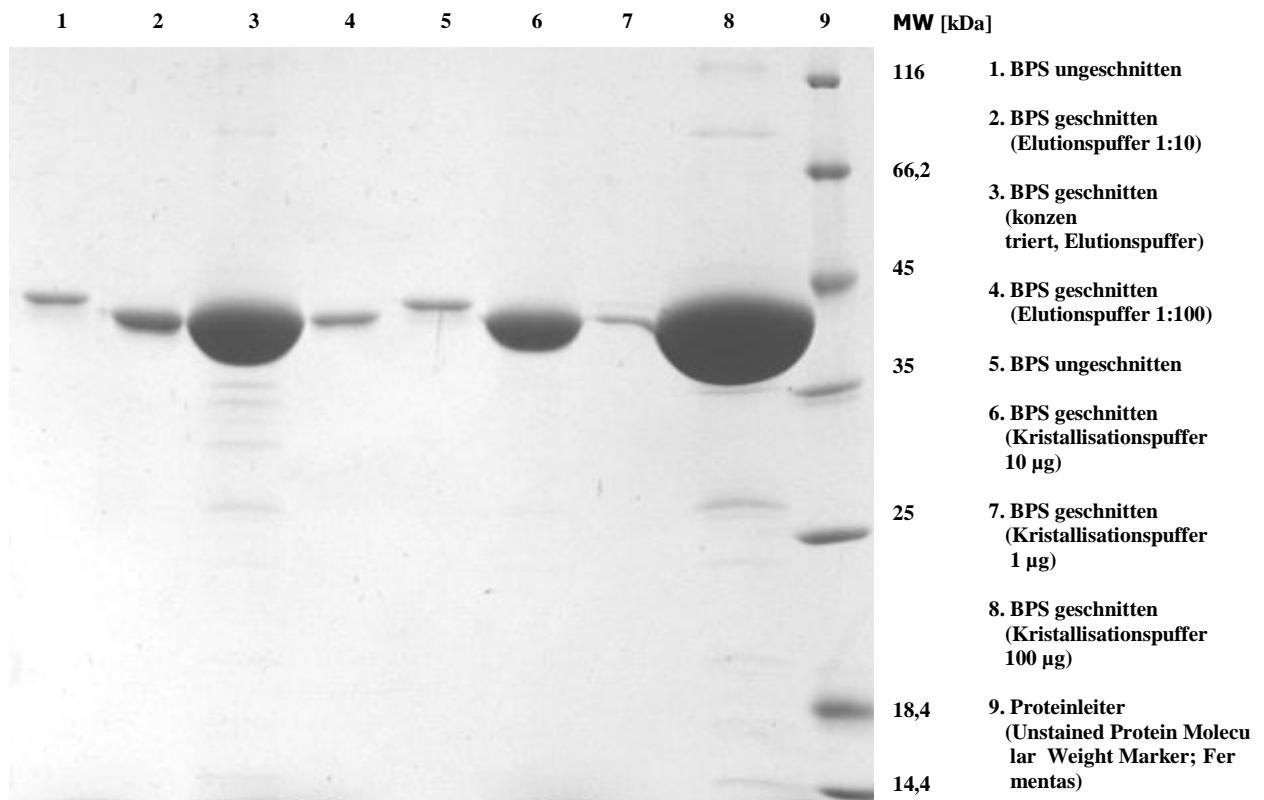
#### 4.2.3.4 Kristallisierung von TEV-Protease-geschnittener und verkürzter BIS1

Als weiterer Ansatz, Proteinkristalle zu erhalten, wurde ein verkürztes Konstrukt der BIS1 hergestellt, bei dem die ersten 13 N-terminalen Aminosäuren der Proteinsequenz entfernt wurden. Die verkürzte BIS1-Variante wurde ebenfalls mit TEV-Protease geschnitten und einem Roboter-Screening unter Verwendung der in Tab. 4.12 angegebenen Kristallisationskits unterzogen. Das verkürzte Konstrukt wurde nach der Reinigung einer Aktivitätsbestimmung unterzogen um sicher zu gehen, dass das Fehlen der ersten 13 Aminosäuren keinen Aktivitätsverlust bedeutete. Die gemessene Aktivität entsprach der des unverkürzten Wildtyps. Es wurden Proteinlösungen von 10 und 20 mg/ml verwendet. Auch in diesem Ansatz kam es bei einigen Bedingungen zur Bildung von kleinen Proteinkristallen, da diese aber zeitgleich mit denen des unverkürzten Konstrukts entstanden, wurden sie nicht weiter untersucht.

#### 4.2.4 Expression und Reinigung der Benzophenonsynthase

Die BPS wurde bereits von Raeth (2007) in den Expressionsvektor pET28c kloniert und stand damit schon für das Schneiden mit Thrombin zur Verfügung. Die Aufreinigung erfolgte analog der Aufreinigung der BIS1, wobei das His<sub>6</sub>-Tag mit Streptavidin-Agarose aus dem Ansatz entfernt wurde. Im SDS-Polyacrylamidgel wurde das Schneiden kontrolliert (Abb. 41). Auch für die BPS wurde ein verkürztes Konstrukt angefertigt, bei dem - wiederum nach einem Alignment mit der CHS aus *Medicago sativa* - 19 Aminosäuren entfernt wurden. Dazu wurden die Primer 5HaBPS TEV (sense) und HaBPSEcoR1 (antisense) verwendet (2.1.8). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Konstrukt jedoch noch nicht exprimiert.





**Abbildung 39:** SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Reinheit von BPS

#### 4.2.5 Kristallisierung der Benzophenonsynthase

Neben der Biphenylsynthase aus *Sorbus aucuparia* sollte auch die Benzophenonsynthase aus *Hypericum androsaemum*, die den in 4.3 beschriebenen Inhibitionsversuchen zugrunde lag, kristallisiert werden. Die Kristallstruktur sollte die von Dr. Bocola, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, durch Homologie-Modellierung erstellte Struktur untermauern. Es wurden verschiedene Versuche mit Thrombin-geschnittenem und ungeschnittenem Protein unternommen.

##### 4.2.5.1 Kristallisierung von Thrombin-geschnittener BPS

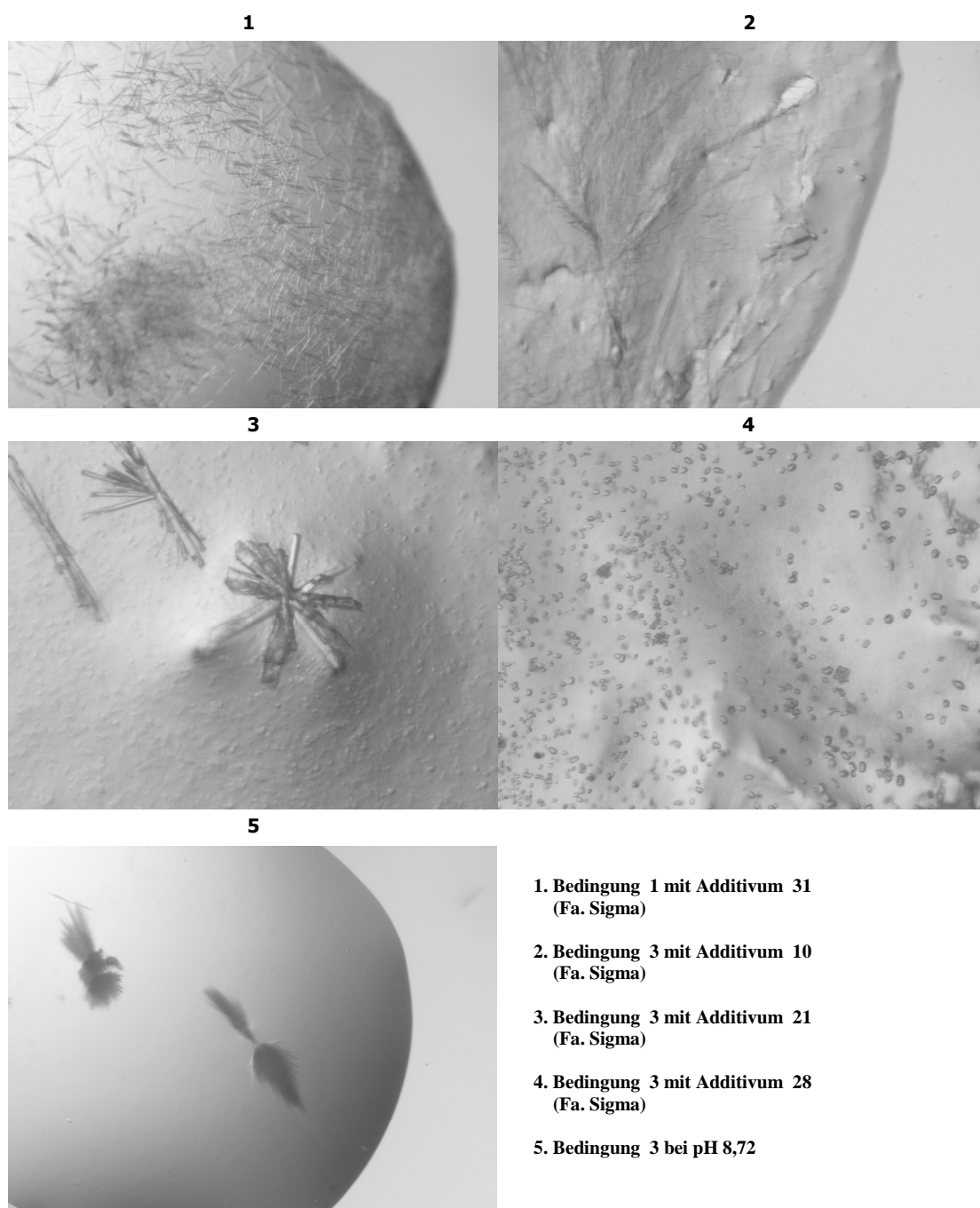
###### 4.2.5.1.1 Kristallisierung nach der „hanging drop“ Methode mit Additiva

Zum Einstieg wurden auch hier die Bedingungen ausgewählt, bei denen Raeth (2007) bereits kleine Kristalle gewinnen konnte (Tab.4.14). Die Tropfen wurden nach der „hanging drop“ Methode angesetzt, wobei die BPS in den Konzentrationen 7,5 mg/ml und 11,5 mg/ml eingesetzt wurde. Die Tropfen setzten sich jeweils aus 2 µl Proteinlösung, 2 µl Pufferlösung und 0,1 µl der Additiva der Firma Sigma zusammen.

Tab.4.14: Bedingungen mit Kristallbildung nach Raeth (2007)

Bedingung	Zusammensetzung	Name des Kits
1	1,6 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M MES pH 6,5 10% Dioxan	Sigma Extension Kit , Nummer 21
2	2% Dioxan 0,1 M Bicin pH 9,0 10% PEG 20000	Sigma Extension Kit , Nummer 46
3	14% PEG 10000 0,1 M Imidazol-HCl pH 8,0	JBScreen classic 5, Nummer 17

Kristallbildung erfolgte bei den Bedingungen 1 mit Additivum 31 (Additiva-Kit der Firma Sigma), Bedingung 2 mit Zusatz der Additiva Nummer 6, 31 und 42 sowie bei Bedingung 3 mit den Additiva 10, 21, 22 und 28 (Additiva-Kit der Firma Sigma) und Bedingung 3, pH 8,72. Die erhaltenen Kristallbilder sind in Abb. 42 dokumentiert. Ein Teil der Kristalle wurde für das Seeding verwendet. Da die gebildeten Kristalle nicht streuten, wurde ein neuer Versuch unternommen.



**Abbildung 40:** Kristallbildung unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen

In einem erneuten Versuch wurde die BPS in den Konzentrationen 9 mg/ml und 11,5 mg/ml eingesetzt. Auf jeder Platte wurden zwei Tropfen mit den entsprechenden Konzentrationen angesetzt. Jede Pufferbedingung (Tab. 4.14) wurde nach folgendem Pipettierschema eingesetzt (Tab. 4.15), wobei das Verhältnis von Proteinlösung : Pufferlösung in  $\mu\text{l}$  angegeben ist.

Tab.4.15: Pipetierschema zur BPS-Kristallisierung

Bedingung	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4	Gefäß 5	Gefäß 6
1	2,5 : 2,5	2,4:2,6	2,3: 2,7	2,2:2,8	2,1:2,9	2,0:3,0
	2,6:2,4	2,7:2,3	2,8:2,2	2,9:2,1	3,0:2,0	3,1:1,9
2	2,5 : 2,5	2,4:2,6	2,3: 2,7	2,2:2,8	2,1:2,9	2,0:3,0
	2,6:2,4	2,7:2,3	2,8:2,2	2,9:2,1	3,0:2,0	3,1:1,9
3	2,5 : 2,5	2,4:2,6	2,3: 2,7	2,2:2,8	2,1:2,9	2,0:3,0
	2,6:2,4 *	2,7:2,3 *	2,8:2,2 *	2,9:2,1 *	3,0:2,0	3,1:1,9

Bei den in Tab. 4.15 mit „\*“ gekennzeichneten Bedingungen erfolgte Kristallwachstum. Die gebildeten Kristalle waren allerdings nicht für die Röntgenbeugungsanalyse geeignet. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um Proteinkristalle oder Salzkristalle handelte.

#### 4.2.5.1.2 Seeding

Für das Seeding wurden die Kristalle der Bedingung 2 bei Zusatz der Additiva 6, 31 und 42 sowie der Bedingung 3 bei Zugabe des Additivums 22 verwendet. Die Auswahl erfolgte zufällig. Die Kristalle wurden in Tropfen von frisch angesetzter BPS (14 mg/ml) und Pufferlösung der Bedingung 2 überführt. Auch das Seeding konnte nicht zur Bildung größerer Kristalle beitragen.

### 4.2.5.2 Kristallisierung von ungeschnittener BPS

#### 4.2.5.2.1 Roboter-Screening nach „sitting drop“ Methode

Da mehrere Versuche, die mit Thrombin geschnittene BPS zu kristallisieren, fehlgeschlagen waren, wurde beschlossen, Versuche mit ungeschnittenem Protein in höherer Konzentration durchzuführen. Hierzu wurde zunächst ein komplettes Screening nach der „sitting drop“ Methode mit dem Roboter angesetzt. Verwendet wurde BPS der Konzentration 30 mg/ml mit den folgenden Kristallisationspuffern (Tab. 4.16).

Tab.4.16: Tabelle der für BPS verwendeten Kristallisationskits

Name des Kits	Firma
JBScreen classic 1-10	Jena Bioscience
JBScreen JCSG ++ 1-4	
Sigma basic	Sigma
Sigma cryo	
Sigma low ionic	
Sigma membrane proteins	
Sigma extension	
House factorials	Inst. Für Physikal. Biochemie Halle
Molecular Dimensions Morpheus	Molecular Dimensions

#### 4.2.5.2.2 Kristallisierung nach der „hanging drop“ Methode

Im Kristallisationspuffer der Bedingung D2 Molecular Dimensions Morpheus (0,12 M Alkohole, 0,1 M Puffer1 pH 6,5, 20% Polyethylenglycol, 20% PEG 8000, Fa. Molecular Dimensions) wurden kleine Kristalle beobachtet. Daher wurde diese Bedingung einem genaueren Screening unterworfen. Die BPS wurde in den Konzentrationen 10 mg/ml und 20 mg/ml eingesetzt und nach folgendem Pipettierschema (Proteinlösung : Pufferlösung) pipettiert (Tab. 4.17).

Tab.4.17: Pipettierschema für die „hanging drop“ Methode

BPS-Konz.	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4	Gefäß 5	Gefäß 6
20 mg/ml	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (1 µl Trpf.)	1:1 (2 µl Trpf.)	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (10 µl Trpf.)	1:2 (6 µl Trpf.)
	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (1 µl Trpf.)	1:1 (2 µl Trpf.)	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (10 µl Trpf.)	2:1 (6 µl Trpf.)
10 mg/ml	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (1 µl Trpf.)	1:1 (2 µl Trpf.)	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (10 µl Trpf.)	1:2 (6 µl Trpf.)
	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (1 µl Trpf.)	1:1 (2 µl Trpf.)	1:1 (5 µl Trpf.)	1:1 (10 µl Trpf.)	2:1 (6 µl Trpf.)

#### 4.2.5.2.3 Kapillarkristallisierung

Unter der obigen Bedingung (4.2.5.2.2; 0,12 M Alkohole, 0,1 M Puffer1 pH 6,5, 20% Polyethylenglycol, 20% PEG 8000, Fa. Molecular Dimensions) wurde außerdem die Kapillarkristallisierung eingesetzt. Es wurden jeweils Kapillaren mit dem Durchmesser 0,1 , 0,2 und 0,3 mm mit beiden Konzentrationen gefüllt.

Es war weder im „hanging drop“ Verfahren noch bei der Kapillarkristallisierung möglich, Kristalle zu gewinnen, die der Röntgenbeugungsanalyse zugänglich waren.

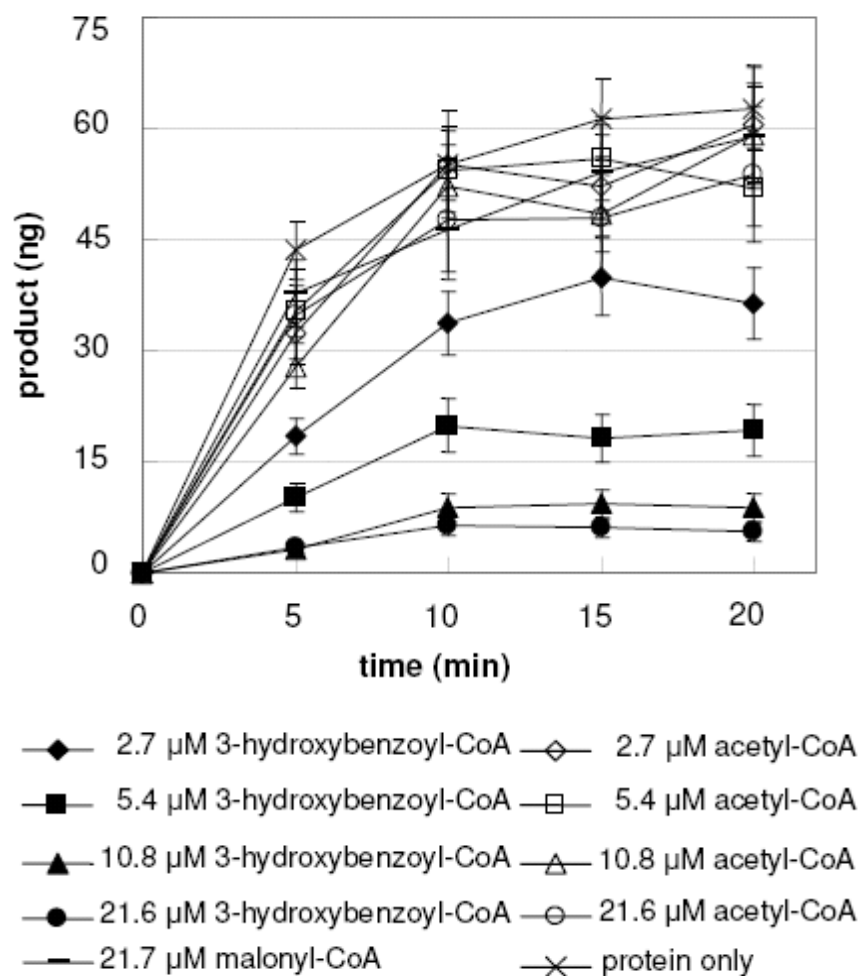
### 4.3 Inhibitionsversuche zur BPS-Mutante T135L

Im Rahmen der Arbeit von Klundt (2008) konnte gezeigt werden, dass die Benzophe-nonsynthase Benzoyl-CoA als bestes und 3-Hydroxybenzoyl-CoA als zweitbestes Startersubstrat akzeptiert, wobei die Punktmutation T135L mit Benzoyl-CoA nur das zweifach verlängerte Nebenprodukt 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on bildete und mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA nahezu inaktiv war. Aufgrund dieses Verhaltens wurde vermutet, dass das aktive Zentrum der Mutante durch Bildung des 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on blockiert wurde. Dies galt es hier durch Inhibitionsversuche zu beweisen.

Dazu wurde zunächst versucht, das Enzym nach einer 5-minütigen Vorinkubation mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA an Affinitätsmatrix zu binden und dann überschüssige CoA-Ester durch Spülen der Säule mit Inkubationspuffer aus dem Ansatz zu entfernen. Dann wurde das Protein von der Säule eluiert. Die durchgeführte Standardinkubation mit Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA zeigte jedoch im Vergleich zum Blindwert keine Inhibition. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde die Vorinkubation ohne 3-Hydroxybenzoyl-CoA durchgeführt. Es wurde vermutet, dass der gebildete Inhibitor durch die Waschschrte aus dem aktiven Zentrum herausgespült wurde.

In einem zweiten Versuch wurde das Benzoyl-CoA nach der Vorinkubation zum Ansatz gegeben und dieser kurz durchmischt. Die folgende Inkubation zeigte nach einem kurzen unwesentlichen Anstieg des Produkts 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on eine deutliche Inhibition (Abb. 43). Um zu zeigen, dass die Inhibition nicht darauf beruht, dass die im Ansatz vorhandenen, steigenden Konzentrationen von CoA-Estern blockierend wirken, wurde die Vorinkubation ebenfalls mit Acetyl-CoA durchgeführt, welches von der BPS nicht als Startersubstrat akzeptiert wird. In diesem Fall trat keine Inhibition auf, so dass sterische Behinderungen ausgeschlossen werden konnten.

Durch Blindwerte, wobei zum einen Malonyl-CoA und zum anderen nur das Protein für die Vorinkubation eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die 5-minütige Vorinkubation keine negative Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms hatte (Abb. 43).



**Abbildung 41:** Phenylpyronbildung durch die T135L Mutante der BPS nach Vorinkubation mit Malonyl-CoA und steigenden Konzentrationen von 3-Hydroxybenzoyl-CoA oder Acetyl-CoA. Die Kontrollansätze enthielten nur Protein oder Protein und Malonyl-CoA in der Vorinkubation

## 5 Diskussion

### 5.1 Medizinische Bedeutung von Phenylphenalenonen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommen in Wurzelkulturen der Pflanze *Wachendorfia thyrsiflora* verschiedene Phenylphenalenone vor (Abb. 7-9, Brand 2005). Außerdem sind diese Verbindungen beispielsweise in wilden Bananenpflanzen induzierbar (Binks et al., 1997; Hirai et al., 1994; Luis et al., 1994; Kamo et al., 2000). Die kompliziert aufgebauten Naturstoffe weisen für die Medizin interessante Eigenschaften auf. Für Anigorufon und Methoxyanigorufon wurde antileishmanielle Aktivität gegen *Leishmania donovani promastigotes* nachgewiesen (Luque-Ortega et al., 2004; Marty et al., 2002). Diese antileishmaniellen Eigenschaften sind von besonderem Interesse, da die in den Tropen weit verbreitete Leishmaniose schwer zu therapieren und selten komplett heilbar ist. Zur Therapie dieser Erkrankung stehen zur Zeit Pentamidin, Miltefosin und N-Methylglucamin-Antimonat zur Verfügung, die allerdings häufig beachtliche Nebenwirkungen aufweisen. Ausserdem kommen Antibiotika wie Amphotericin B und Paromomycin, ein Aminoglycosid-Antibiotikum, zum Einsatz. All diese Wirkstoffe werden häufig in Kombination mit Allopurinol eingesetzt, welches parasitostatisch wirkt, da die Leishmanien Purine nicht selber synthetisieren können und auf die Synthese im Wirtsorganismus angewiesen sind. Zur Stärkung des Immunsystems kann auch rekombinantes Interferon eingesetzt werden. Eine konstitutive Bildung von Phenylphenalenonen in Bananen könnte somit nicht nur die Bananenpflanze selber vor Pilzbefall und anderen Schädlingen schützen, sondern möglicherweise auch als Food-Additivum protektiv gegen die Leishmaniose wirken. Da eine chemische Synthese von Anigorufon schwierig ist, bietet die biotechnologische Wirkstoffgewinnung eine interessante Option.

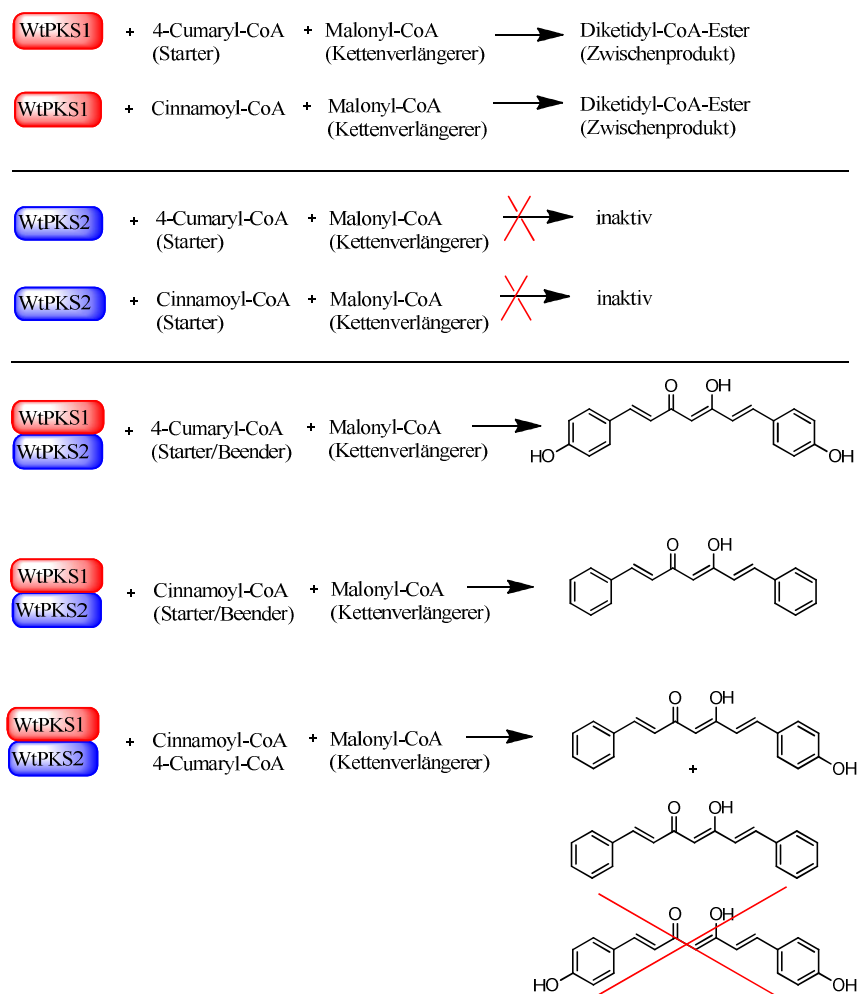
### 5.2 Die Biosynthese der Diarylheptanoide in *Wachendorfia thyrsiflora*

In *Wachendorfia thyrsiflora* wurden die mRNAs für drei induzierbare Typ III PKS gefunden. Da das Enzym WtPKS3 im Vergleich zu den anderen beiden PKS nur schwach induzierbar war und in Inkubationen nur aliphatische Starter akzeptierte (Brand, 2005), wurde dieses Enzym in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Für das Enzym WtPKS2 allein konnte zunächst keine Aktivität nachgewiesen werden. Diese Aussage bestätigte sich in den Reaktionsansätzen, in denen lediglich Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl- bzw. Cinnamoyl-CoA eingesetzt wurden. Da die mRNA für



dieses Enzym jedoch ebenso induzierbar war wie die für WtPKS1 und die Gabe von Elizitoren zu einem Anstieg von Methoxyanigorufon und Anigorufon in den Wurzelkulturen führte, war es wahrscheinlich, dass auch diese PKS an der Bildung der Phenylphenalenone beteiligt ist. Durch erneute Experimente mit den aufgereinigten Enzymen konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit beiden Enzymen zusammen (WtPKS1 und WtPKS2) sowie Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl- bzw. Cinnamoyl-CoA zur Bildung der entsprechenden Diarylheptanoide führte, wie in Abb. 44 dargestellt.



**Abbildung 42:** Reaktionsübersicht der Enzyme WtPKS1 und WtPKS2 mit verschiedenen Starter-CoA-Estern

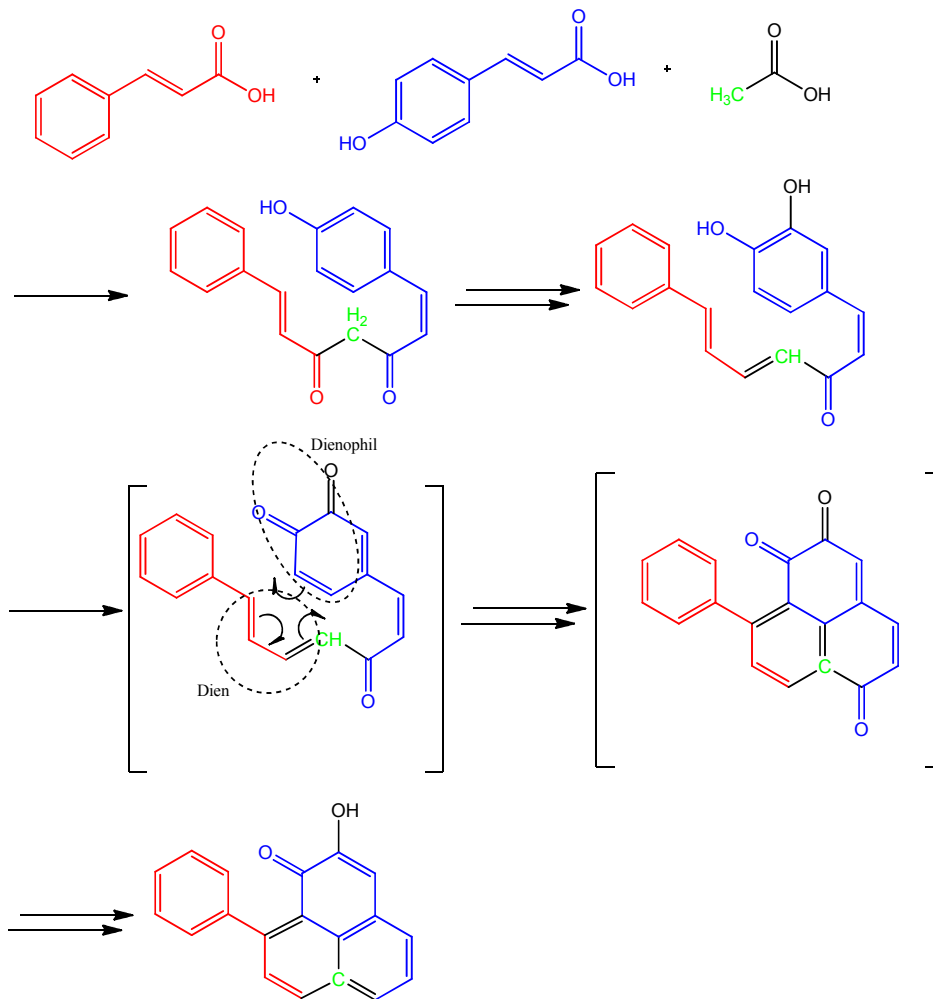
In dieser Arbeit wurden 4-Cumaryl-CoA und Cinnamoyl-CoA verwendet, da diese im Gegensatz zu den anderen von Brand (2005) getesteten Startern die einzigen sind, die auch *in vivo* vorkommen (Brand et al., 2006). Zudem war bei diesen Startern auch das Produkt nach der Verlängerung mit einem Molekül Malonyl-CoA, das entsprechende Ben-

zalaceton nachweisbar, wobei das Produktverhältnis von Einfach- zu Zweifach-Verlängerung beim 4-Cumaroyl-CoA 4:1, beim Cinnamoyl-CoA 1:4 betrug (Brand et al., 2006). Unter Berücksichtigung der natürlichen Verhältnisse wurde 4-Cumaroyl-CoA somit als bester Starter für das Enzym WtPKS1 angesehen. Andere CoA-Ester wurden von der WtPKS1 zwar bevorzugt akzeptiert, darunter aliphatische Starter wie n-Hexanoyl-CoA oder gesättigte Phenylpropanoide wie Dihydrocinnamoyl-CoA, aber hier konnten hauptsächlich die Pyrone detektiert werden (Brand et al., 2006). Die Bildung von Pyronen bei der Verwendung von unspezifischen Startersubstraten wurde schon für andere PKS aus der CHS-Superfamilie beschrieben (Schröder, 2000; Austin and Noel, 2003).

Bei einem Blick auf die graphische Darstellung der kinetischen Eigenschaften kann man feststellen, dass nur das Diagramm für Malonyl-CoA der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Malonyl-CoA wird nur von der WtPKS1 genutzt, um den Diketidyl-Ester aufzubauen. Für Cinnamoyl-CoA ergibt sich dagegen eine Kurve mit sigmoidem Verlauf, wie sie für allosterische Enzyme typisch ist. Cinnamoyl-CoA wird sowohl von der WtPKS1 als auch von der WtPKS2 genutzt. Da zunächst der Diketidyl-Ester von der WtPKS1 gebildet werden muss, beginnt die Diarylheptanoid-Bildung hier schleppend, steigt dann jedoch bei höheren Konzentrationen schnell an und erreicht das Maximum bei etwa 150  $\mu\text{M}$  Cinnamoyl-CoA ( $K_m = 75 \mu\text{M}$ ). Eine solche Kinetik findet man auch für die DCS (Diketid-CoA-Synthase) aus *Curcuma longa*, bei der es sich vermutlich um ein allosterisches Enzym handelt (Katsuyama et al, 2009). In der graphischen Darstellung der Kinetik für 4-Cumaroyl-CoA kann man erkennen, dass der Anstieg des gebildeten Bisdesmethoxycurcumins gleichmäßiger verläuft und das Maximum erst bei einer Konzentration von 700  $\mu\text{M}$  erreicht wird. In der Vergrößerung kann man auch hier einen sigmoiden Verlauf erkennen. Somit deuten die bisherigen Daten darauf hin, dass die Bildung des Diketidyl-Esters mit 4-Cumaroyl-CoA effizienter verläuft als mit Cinnamoyl-CoA, wohingegen für die zweite Reaktion Cinnamoyl-CoA bevorzugt ist.

Diese Annahmen bestätigten sich durch Inkubationen, bei denen beiden Enzymen in Kombination eine Mischung aus Cinnamoyl-CoA und 4-Cumaryl-CoA sowie Malonyl-CoA in gesättigten Konzentrationen angeboten wurde. Hier kam es zur Bildung von 5-Hydroxy-1,7-diphenylhepta-1,4,6-trien-3-on (Produkt aus zwei Cinnamoyl-CoA- und einem Malonyl-CoA-Molekül) und auch 5-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-1,4,6-trien-3-on (Produkt aus einem Molekül Cinnamoyl-CoA, einem Mo-

lekül 4-Cumaroyl-CoA und einem Molekül Malonyl-CoA). Aber kein Bisdesmethoxycurcumin (Produkt aus zwei 4-Cumaroyl-CoA-Molekülen und einem Malonyl-CoA-Molekül) wurde nicht gebildet. Das Produktverhältnis zwischen dem Produkt mit einer phenolischen OH-Gruppe und dem ohne phenolische OH-Gruppe betrug 2:1. Da kein Bisdesmethoxycurcumin gebildet wurde, scheint der zweite Reaktionsschritt bevorzugt mit Cinnamoyl-CoA abzulaufen. Diese Ergebnisse werden durch das Inhaltsstoffspektrum der *W. thyrsoflora*-Wurzelkulturen bestätigt (Abb. 7-9). Alle detektierten Phenylphenalenone weisen eine Keto-Funktion in Position 1 auf, welche aus 4-Cumaroyl-CoA stammt und gegebenenfalls derivatisiert sein kann (Abb. 8, 9: F-H, J, L-N). Wie aus dem Reaktionsschema der Biosynthese (Abb. 45) hervorgeht, ist diese essentiell für die Zyklisierung, da sie das Dienophil stabilisiert. In 4'-Position des Phenylrings ist dagegen nur in einem Fall eine Hydroxygruppe zu finden (Abb. 9: M), was ebenfalls darauf hindeutet, dass Cinnamoyl-CoA für den zweiten Reaktionsschritt bevorzugt verwendet wird.



**Abbildung 43:** Biosynthese von Anigorufon (nach Brand, 2005)

Wie genau die beiden Enzyme WtPKS1 und WtPKS2 die Diarylheptanoide aufbauen, konnte bisher nicht geklärt werden, allerdings steht fest, dass die Bildung nur erfolgt, wenn beide Enzyme im gleichen Reaktionsansatz vorhanden sind. Für *Curcuma longa* wurde kürzlich ein ähnlicher Mechanismus beschrieben (Katsuyama et al., 2009). Die Diketid-CoA-Synthase (DCS) katalysiert die Kondensation des ersten Moleküls Feruloyl-CoA mit Malonyl-CoA und die Curcuminsynthase (CURS) kondensiert den gebildeten Diketidyl-CoA-Ester mit einem zweiten Molekül Feruloyl-CoA zum Curcumin. Die CURS ist allerdings im Gegensatz zur WtPKS2 auch in der Lage, wenn auch in einem deutlich geringeren Ausmaß als im Kombinationsansatz mit der DCS, die Diarylheptanoide allein zu synthetisieren. Außerdem akzeptierte die CURS einen Diketidyl-NAC-Ester als Starter für die Reaktion mit einem weiteren CoA-Ester. Beides war für die

WtPKS2 nicht nachweisbar. Ein Sequenzvergleich der DCS mit der WtPKS1 zeigt eine Identität von 63%, und die CURS und die WtPKS2 ähneln sich zu 62%.

Da ein enges Zusammenspiel der beiden WtPKS-Enzyme vermutet wurde, sollte in einem nicht denaturierendem Polyacrylamidgel eine Komplexbildung nachgewiesen werden. Dazu wurden die WtPKS1 und die WtPKS2 jeweils einzeln und in Kombination auf das Proteingel geladen. Bei Kombination der beiden Enzyme ließ sich eine zusätzliche Bande nachweisen, die sich zwischen den beiden Einzelbanden befand. Um zu zeigen, dass diese Aggregation nicht auch unter anderen Typ III PKS stattfindet, wurden auch die BIS1 und die CHS aus *Sorbus aucuparia* sowie die BPS aus *Hypericum androsaemum* allein und in Kombination mit jeweils einem der beiden WtPKS aus *W. thyrsoiflora* aufgetragen. Eine zusätzliche Bande war hier nicht nachweisbar. Dies ist ein erster Hinweis auf eine Komplexbildung speziell der beiden PKS aus *W. thyrsoiflora*, was bisher noch für keine anderen Typ III PKS beschrieben wurde. Dieser interessante Sachverhalt muss allerdings noch durch weitere Versuche, z.B. Co-Kristallisierung der Enzyme, nachgewiesen werden.

### 5.3 Kristallisierung der Biphenylsynthase und der Benzophenonsynthase

Über die Kristallstruktur sollte im Rahmen dieser Arbeit insbesondere der Reaktionsmechanismus der Biphenylsynthase aus *Sorbus aucuparia* aufgeklärt werden. Obwohl in vorrausgegangenen Experimenten schon Kristalle der BIS1 vermessen wurden (Raeth, 2007), waren die Ergebnisse zunächst nicht reproduzierbar. Wie sich am Ende der Bemühungen herausstellte, war das Hauptproblem eine geeignete Methode zu finden, mit der das His<sub>6</sub>-Tag schonend entfernt werden konnte. Da das modifizierte Trypsin, mit dem Raeth (2007) die BIS1 so schneiden konnte, dass eine anschließende Kristallisierung gelang, nicht mehr verfügbar war, wurde das Enzym zunächst in einen Vektor umklont, in dem das Schneiden mit Thrombin möglich war. Obwohl das Protein am Ende der Reinigungsprozedur noch Aktivität besaß, war diese im Vergleich zum ungeschnittenen Protein um etwa 30% reduziert, so dass die Proteinlösung durch bereits entfaltetes Protein vermutlich zu inhomogen war. Für die Proteinkristallisierung bedarf es nach Raeth (2007) einer Reinheit von 98%, damit sich Kristalle bilden können. Eine weitere Möglichkeit, warum es zu einer erfolgreichen Kristallbildung kam, lag in dem leicht veränderten Konstrukt. Nach dem Schneiden mit Thrombin verbleiben wenige

Aminosäuren vor dem Start-Methionin (Abb. 38), wobei die Schnittstelle für das modifizierte Trypsin direkt vor der BIS1-Sequenz lag.

Zur Zeit ist auch die Kristallisation mit dem His<sub>6</sub>-Tag in der Diskussion (Carson, et al. 2007). Es gibt Proteine, für deren Kristallisation das His-Tag zwingend notwendig war (Tajika et al., 2004). Ebenso gibt es Proteine, bei denen sowohl die getaggte als auch die ungetaggte Variante kristallisiert werden konnte und die Strukturen praktisch identisch waren, abgesehen davon, dass die getaggte Variante eine etwas bessere Auflösung hatte (Taylor et al., 2005). Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit versucht, mit dem His<sub>6</sub>-Tag zu kristallisieren. Da sowohl die BIS1 als auch die BPS ohne das Tag aktiv waren, wurde vermutet, dass das Tag in diesem Fall keinen Einfluss auf Struktur und Funktion hat. Obwohl durch viele Modifikationen im Reinigungsprotokoll im Vergleich zu den Ausbeuten von Raeth (2007) etwa 2-3 mal höhere Protein-Ausbeuten gewonnen wurden und die Aufreinigungszeit von 8 auf 5 Tage reduziert wurde, also die verwendete Proteinlösung frischer war, wurden für beide Proteine keine Kristalle gezüchtet, die der Röntgenanalyse zugänglich waren.

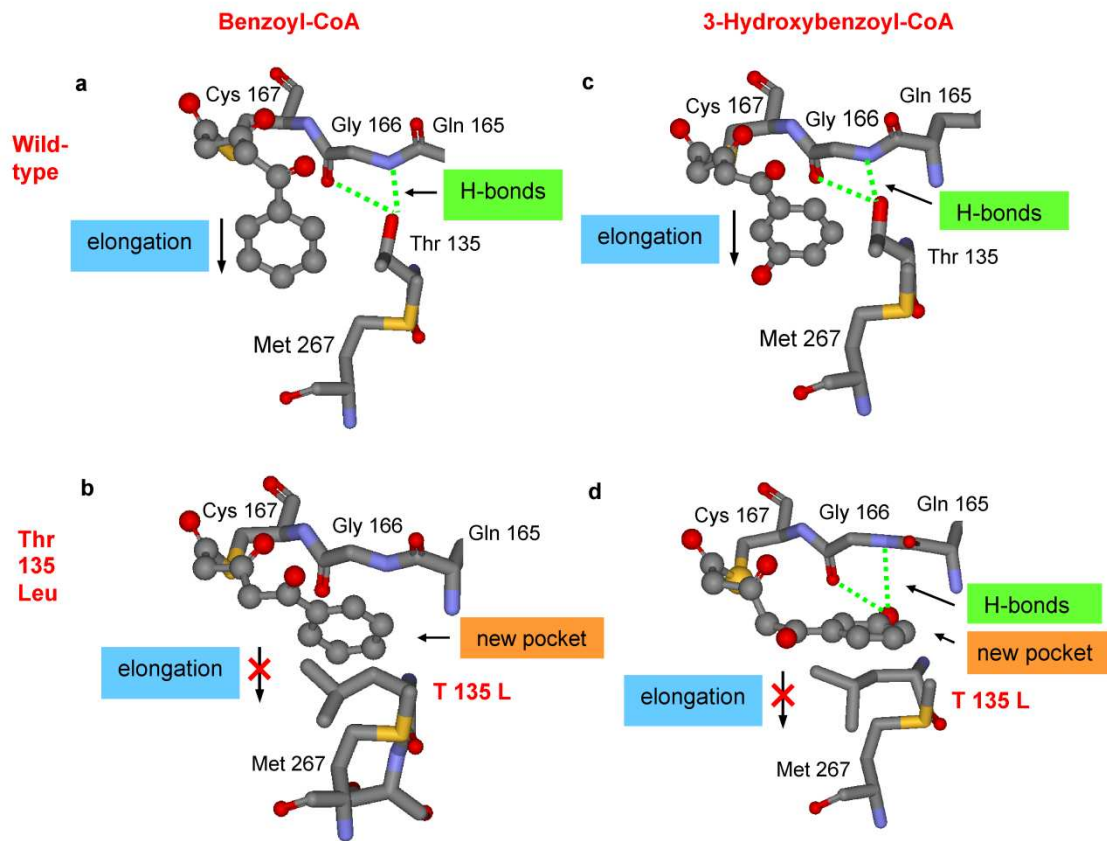
Trotz aufwendiger Bemühungen konnte die Kristallisierung erst nach Entfernen des His<sub>6</sub>-Tags mittels TEV-Protease erreicht werden. Die Kristallbildung war in mehreren auf gleiche Weise hergestellten Chargen reproduzierbar. Dadurch sollte es möglich sein, die Arbeit an diesem Projekt zu einem späteren Zeitpunkt weiterzuführen. Da manchmal schon geringfügige Variationen in der Zusammensetzung der Proteinlösung sowie bei den Pufferbedingungen massive Auswirkungen auf die Kristallbildung und das Aussehen der Kristalle haben (s. Kristallbilder in Abb. 42), sollte allerdings mit der nächsten Charge noch einmal ein komplettes Screening zum Einstieg durchgeführt werden.

#### 5.4 Inhibitionsversuche

Um die Mechanismen von Enzymen aufklären zu können, gibt es zum einen die Möglichkeit, die Enzyme zu kristallisieren und röntgentechnologisch zu vermessen, und zum anderen die Möglichkeit, über Mutationen im aktiven Zentrum eine Produkt- oder Substratveränderung zu bewirken und daraus Rückschlüsse auf die Funktion zu schließen. Letzteres wurde schon an vielen Typ III PKS durchgeführt. So konnte zum Beispiel die CHS von *Medicago sativa* durch eine Dreifach-Mutation (T197L/G256L/S338I) in eine funktionelle 2PS (2-Pyronsynthase) umgewandelt wer-

den, da die Initiations-/Elongationstasche im aktiven Zentrum von 923 auf 274 Å<sup>3</sup> verringert wurde und damit die Tasche zu klein wurde, um das sperrige 4-Cumaroyl-CoA aufzunehmen (Jez et al., 2000). Das gelingt jedoch nicht gleichermaßen für alle Enzyme. Als die entsprechenden Mutationen (T200L/G342I/A260L) an der BPS durchgeführt wurden, war die Dreifachmutante sowohl mit Benzoyl-CoA als auch mit Acetyl-CoA inaktiv (Klunt et al., 2009). Leider sind die strukturellen Zusammenhänge in Enzymen schwer vorherzusagen, da eine einzelne Mutation in der Lage ist, die Struktur des Enzyms so grundlegend zu verändern, dass sie inaktiv werden. In *Aloe arborescens* öffnete der Austausch von Methionin in Position 207 gegen Glycin zwei hinter dem aktiven Zentrum gelegene Taschen und vergrößerte das Volumen der Bindetasche so sehr, dass die Pentaketidchromonsynthase (PCS) in eine Oktaketidsynthase (OKS) verwandelt werden konnte (Morita et al., 2007). Als die entsprechende Aminosäure (Thr200) in der BPS von *Hypericum androsaemum* gegen Glycin ausgetauscht wurde, resultierte allerdings eine inaktive Form des Proteins (Klunt et al., 2009).

In der Einleitung wurden bereits die Veränderungen in der Substrat- und Produktspezifität bei der Transformation des BPS-Wildtyp in Mutante T135L beschrieben. Nach der Homologie-Modellierung geht man von folgendem Sachverhalt aus (Klunt et al., 2009). In der Wildtyp-BPS bildet die Hydroxygruppe des Threonins in Position 135 Wasserstoffbrückenbindungen mit dem polaren Grundgerüst des Gly166, wobei die Seitenkette des Threonins den Zugang zu der Elongationstasche nicht behindert und diese in der Lage ist, das Tetraketid aufzunehmen (Abb. 46). Dieser Weg wird allerdings durch die sperrige Seitenkette des eingeführten Leucins in der Mutante T135L blockiert. Dafür öffnet sich der Zugang zu einer neuen Tasche, der im Wildtyp durch die Wasserstoffbrückenbindungen des Thr135 verschlossen ist. Der Austausch des polaren Threonins in Position 135 gegen die apolare Aminosäure Leucin öffnet vermutlich eine neue Tasche, in die das Triketid während der Verlängerung der Polyketidkette umgeleitet wird (Abb. 46). Da diese Tasche verglichen mit der Initiations- und Elongationstasche der BPS kleiner ist, wird eine weitere Verlängerung zum Tetraketid verhindert und es kommt zum Kettenabbruch und zur heterozyklischen Laktonbildung (Produkt ist dann lediglich das 6-Phenyl-4-hydroxy-2-pyron). In der Stilbensynthase ist Threonin 135, welches in der CHS von *M. sativa* dem Threonin 132 entspricht, für den veränderten Zyklisierungsmechanismus verantwortlich, also für das Umschalten von Claisen-Zyklisierung auf Aldolzyklisierung (Austin et al., 2004).



**Abbildung 44:** CHS-basierte Homologie-Modelle der aktiven Zentren von Wildtyp-BPS (a,c) und Mutante T135L (b,d). Das Benzoyl-Triketid (a,b) und das 3-Hydroxybenzoyl-Triketid sind kovalent an das Cys167 im aktiven Zentrum gebunden. Der Wildtyp katalysiert eine weitere Acetyl-Addition an das Triketid-Intermediat. In der Mutante werden die Triketide in eine neue Tasche geleitet, die keine weitere Elongation zulässt (nach Klundt et al., 2009)

Da das 3-Hydroxybenzoyl-CoA zwar der zweitbeste Starter für den Wildtyp, aber ein schlechter Starter für die Mutante war, wurde auf Grundlage der CHS-basierten Homologie-Modellierung vermutet, dass das zweifach verlängerte 3-Hydroxybenzoyl-Triketid über seine 3-Hydroxygruppe so fest an das Rückgrad der veränderten Bindetasche gebunden wird, dass es dort als Inhibitor agiert. Die Vorinkubationen mit Malonyl-CoA und steigenden Konzentrationen an 3-Hydroxybenzoyl-CoA sorgten für eine abnehmende Bildung des Phenylpyrons in einer nachgeschalteten Inkubation mit Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA. Da die Inhibierung nachweislich nicht durch allgemein zu hohe CoA-Ester-Konzentrationen zustande kam und auch nicht aus einer Inaktivierung des Proteins hervorging, ist es wahrscheinlich, dass das Modell die realen Bindungsverhältnisse widerspiegelt. Endgültig können diese jedoch erst durch die Vermessung der kristallisierten BPS und T135L-Mutante bewiesen werden.



## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Diarylheptanoidsynthese

Die Diarylheptanoid-Bildung erfolgt nur, wenn die hier untersuchten Enzyme aus *Wachendorfia thyrsiflora*, WtPKS1 und WtPKS2, zusammen im gleichen Inkubationsansatz vorliegen.

Für Cinnamoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA folgt die Reaktion einer sigmoiden Kinetik, wobei die Sättigungskonzentrationen bei 150  $\mu\text{M}$  bzw. 700  $\mu\text{M}$  lagen.

Die WtPKS2 verwendet keine Diketidyl-NAC-Ester, was auf einen Komplex der beiden Enzyme hindeutet. In einem nicht-denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel war die Zusammenlagerung nachweisbar.

### 6.2 Kristallisierung

Durch eine Optimierung des Reinigungsprotokolls konnten Proteinausbeuten von über 30 mg in großer Reinheit erzielt werden.

Für die BIS1 wurden reproduzierbare Kristallisationsbedingungen erarbeitet.

Für die BPS wurden ebenfalls Pufferbedingungen mit Kristallbildung gefunden, bedürfen aber weiterer Optimierung.

Anhand der bisher vermessenen Kristalle war es nicht möglich, die Strukturen der Enzyme aufzuklären. Allerdings steht die Vermessung der optimierten BIS1-Kristalle noch aus.

### 6.3 Inhibitionsversuche

Die Inhibierung der BPS-Mutante T135L durch 3-Hydroxybenzoyl-gestartetes Triketid konnte bewiesen werden, was die durch Homologie-Modellierung aufgezeigte Struktur untermauert.

## Quellen

- Abd El-Mawla, A. M. A., Schmidt, W., Beerhues, L., 2001**, „Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN.”, *Planta* 212: 288-293
- Abd El-Mawla, A. M. A., Beerhues, L., 2002**, “Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*”, *Planta* 214: 717-733
- Austin, M.B. and Noel, J.P., 2003**, “The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases”, *Nat. Prod. Rep.* 20: 78-110
- Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, Schröder J and Noel JP (2004)**, “An aldol switch discovered in stilben synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases”, *Chemistry & Biology*, 11: 1179-1194
- Beerhues, L., 1996**, “Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaureum erythraea*”, *FEBS Letters* 383: 264-266
- Bertram, S., Gassen, H.G., 1991**, „Genetische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanweisungen für das molekularbiologische Arbeiten“, *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
- Bielak-Zmijewska, A., 2000**, “Effect of curcumin on the apoptosis of rodent and human non-proliferating and proliferating lymphoid cells”, *Nutr. Cancer* 38: 131-138
- Binks, R.H., Greenham, J.R., Luis, J.G. and Gowen, S.R., 1997**, “A phytoalexin from roots of *Musa accuminata* var. Pisang sipulu”, *Phytochemistry* 45: 47-49
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979**, „A Rapid alkaline extraction procedure for scanning of recombinant plasmid DNA”, *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523
- Bradford, M., 1976**, “A rapid and sensitive method for quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding”, *Anal. Biochem.* 72: 245-248
- Brand S. Hölscher D, Schierhorn A, Svatoš A, Schröder J, Schneider B, (2006)** “A type III Polyketidsynthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis”, *Planta* 224: 413-428
- Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C. and DeLucas, L. J., 2007**, “His-tag impact on structure”, *Acta Cryst.* 63: 295-301
- Chatterjee, S. S., Bhattercharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W. E., (1998)** „Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts”, *Life Sci.* 63: 499-510

- Chen, Z.F., Liang, H., 2010**, „Progress in TCM metal-based antitumour agents.“, *Anticancer Agents Med. Chem.* 10: 412-423
- Craenen, K., Ortiz, R., 1998**, “Influence of black Sigatoka disease on the growth and yield of diploid and tetraploid hybrid palmtains”, *Crop protection* 17: 13-18
- Donadio S, Katz L (1992)** “Organazation of the enzyatic domains in the multifunktional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccheropolyspora erythraea*”, *Gene* 111, 51-60
- Dorai, T., Gehani, N., Katz, A., 2000**, „Therapeutic potnetial of curcumin in human prostate cancer II. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor and depletes the protein”, *Mol. Urol.* 4:1-6
- Ferrer J.-L.,Jez J.M., Bowman M.E., Dixon R.A. Noel J.P., 1999** “Structure of chalcone synthase and molecular basis of plant polyketide biosynthesis”, *Nature Struktual Biologie* 8: 775-784
- Flors C. ans Nonell S., (2006)**, „Light and Singlet Oxygen in Plant Defense Against Pathogens: Phototoxic Phenalenone Phytoalexins“, *Accounts of Chemical Research* 39: 293-300
- Hirai, N., Ischida, H. und Koschimizu, K., 1994** „A phenalenone-type phytoalexin from *musa accuminat*”, *Phytochemistry* 37: 1994, 383-385
- Hölscher D., Schneider B., (1995)** “A diarylheptanoid intermediate in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preisii*”, *Journal of the chemical society, Chemical communications* 525-526
- Hölscher D., Schneider B., (1995)**,”The biosynthetic origin of the central one-carbon of phenylphenalenones in *Anigozanthos preisii*, *Natural Product Letter* 7: 1995, 177-182
- Jez J.M., Austin M.B.,Ferrer J-L.,Bowman M.E., Schröder J. and Noel J.P. 2000**,” Structural control of polyketide formation in plant specific polyketide synthases.”, *Chemistry & Biology* 7: 2000, 913-930
- Jez JM, Austin MB, Ferrer JL, Bowman ME, Schröder ME and Noel JP, (2000)**, *Chem. Biol.* 7, 919-930
- Jiang, M.C., Yang-Yen, H.F., Yen, J.J., Lin, J.K., 1996**, “Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines.”, *Nutr. Cancer* 26: 111-120
- Kamo, T., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D. und Ohigaschi, H., 2001** “Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit”, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64: 2089-2098

- Karppinen, K., Hokkanen, J., Mattila, S., Neubauer, P., Hohtola, A., 2008**, „Octaketide-producing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins“, *FEBS Journal* 275: 4329-4342
- Katsuyama, Y., Kita, T., Funa, N., Horinouchi, S., 2009**, “Curcuminoid Biosynthesis by Two Type III Polyketide Synthases in the Herb *Curcuma longa*”, *J. Biol. Chem.* 284: 11160-11170
- Klingauf, P., 2005**, “Hyperforin-Biosynthese, Molekulare Analyse von Polyketidsynthasen aus *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum*”, Dissertation, TU Braunschweig
- Klundt, T., 2008**, “Ortsgerichtete Mutagenese der Benzophenonsynthase von *Hypericum androsaemum*“, Dissertation, TU Braunschweig
- Kludt T, Bocola M, Lütge M, Beuerle T, Liu B, Beerhues L., (2009)** “A Single Amino Acid Substitution converts Benzophenone Synthase into Phenylpyrone synthase”, *J. Biol. Chem.* 284: 30957-30964
- Laemmli, U.K., 1970**, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature* 227: 680-685
- Liu, B., Falkenstein-Paus, H., Schmidt, W., Beerhues, L., 2003**, „Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: c-DNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two Polyketide synthases”, *Plant Journal* 34: 847-855
- Liu, B., Beuerle, T., Beerhues, L., 2004**, „Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures from *Sorbus aucuparia*”, *Planta* 218: 492-496
- Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T., Beerhues, L., 2007**, „Biphenyl synthase, a novel type III Polyketidsynthase“, *Planta* 225: 1495-1503
- Luis, J.G., Quiñones, W., Echeverri, F., Abad, T., Kishi, M.P., Perale, A., 1995**, “New phenylpropane-type phytoalexins from *Musa accuminata*(Colla AAA) Grand Nain”, *Nat. Prod. Lett.* 6: 23-30
- Lukacin, R., Springob, K., Urbanke, C., Ernwein, C., Schröder, G., Schröder, J., Matern, U., 1999**, „Native acridone synthase I und II from *Ruta graveolens* L. form homodimers“, *FEBS Letters* 448: 135-140
- Luque-Ortega JR, Martínez S, Saugar JM, Izquierdo LR, Abad T, Luis JG, Piñero J, Valladares B, Rivas L. 2004)** „Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana

plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 48:1534-40

**Marty P, Rosenthal E, (2002)**, “Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices.” *Expert opinion on Pharmacotherapy* 3: 1101-8.

**Mizuuchi, Y., Shi, S.-P., Wanibuchi, K., Morita, H., Noguchi, H., Abe, I., 2009**, “Novel type III polyketide synthase from *Aloe arborescens*” *FEBS Journal* 276: 2391-2401

**Morita H, Kondo S, Oguro S, Noguchi H, Sugio S, Abe I and Kohno T, (2007)**, *Chem. Biol.* 14, 359369

**Raeth, T., 2007**, “Charakterisierung und Kristallisierung der Biphenylsynthase I von *Sorbus aucuparia*“, Dissertation, TU Braunschweig

**Serazetdinova, L; Ohdach K.H.; Lörz H., (2005)**“Expression of transgenic stilbene synthases causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity” *Journal of Plant Physiology* 162: 985-1002

**Wendt-Pienkowski, E., Huang, Y., Zhang, J., Li, B., Jiang, H., Kwon, H., Hutchinson, C.R., Shen, B., 2005**, *J. Am. Chem. Soc.* 127: 16442-16452

## 7 Anhang

### Kristallisationspuffer

#### 7.1 Puffer zur Kristallisierung von der Firma Jena Bioscience

##### 7.1.1 JBScreen classic 1

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
15% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM CaCl <sub>2</sub>
15% PEG 400	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
15% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
15% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Citrat
25% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM MgCl <sub>2</sub>
25% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
28% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-MES	6,5	100mM Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-MES	6,5	100mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 550	entfällt	100mM Bicine	9,0	100mM NaCl
25% PEG 550	entfällt	100mM Na-MES	6,5	10mM ZnSO <sub>4</sub>
25% PEG 1000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 1000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
15% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
20% PEG 1500	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
20% PEG 2000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM NiCl <sub>2</sub>
25% PEG 2000	entfällt	entfällt		entfällt
30% PEG 2000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	100mM Na-Acetat
20% PEG 3000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Acetat
30% PEG 3000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

##### 7.1.2 JBScreen classic 2

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
4% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	entfällt		entfällt
8% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
10% PEG 4000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
12% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM Na-Acetat
12% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
16% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
16% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Acetat
16% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
18% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt

20% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
22% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Acetat
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
25% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
35% PEG 4000	entfällt	entfällt		entfällt

### 7.1.3 JBScreen classic 3

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
8% PEG 4000	100mM LiCl	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
10% PEG 4000	20% 2-Propanol	entfällt		entfällt
10% PEG 4000	10% 2-Propanol	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
10% PEG 4000	5% 2-Propanol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 4000	20% 2-Propanol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
12% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15% PEG 4000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
16% PEG 4000	10% 2-Propanol	100mM Na-HEPES	7,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 4000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 4000	10% Glycerol	entfällt		200mM MgSO <sub>4</sub>
20% PEG 4000	5% 2-Propanol	entfällt		100mM Na-Citrat
20% PEG 4000	20% 2-Propanol	entfällt		100mM Na-Citrat
20% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	600mM NaCl
20% PEG 4000	10% 2-Propanol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
22% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 4000	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100mM Na-HEPES	7,5	100mM Na-Acetat
25% PEG 4000	8% 2-Propanol	entfällt		100mM Na-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
32% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	800mM LiCl

## 7.1.4 JBScreen classic 4

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
25% PEG 5000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 5000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3% PEG 6000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	100mM KCl
10% PEG 6000	entfällt	entfällt		10mM MgCl <sub>2</sub>
12% PEG 6000	2,0 M NaCl	entfällt		entfällt
15% PEG 6000	5% Glycerin	entfällt		entfällt
15% PEG 6000	50mM KCl	entfällt		10mM MgCl <sub>2</sub>
16% PEG 6000	entfällt	entfällt		10mM Na-Citrat
20% PEG 6000	entfällt	50mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
25% PEG 6000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM LiCl
28% PEG 6000	0,5 M LiCl	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
30% PEG 6000	1,0 M LiCl	entfällt		100mM Na-Acetat
33% PEG 6000	entfällt	entfällt		10mM Na-Citrat
2% PEG 8000	0,5 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt		entfällt
2% PEG 8000	1,0 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt		entfällt
4% PEG 8000	entfällt	entfällt		entfällt
8% PEG 8000	200mM LiCl	entfällt		50mM MgSO <sub>4</sub>
8% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
10% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Zn-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Ca-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	entfällt		50mM Mg-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	entfällt		200mM Mg-Acetat
10% PEG 8000	10% Ethylenglycol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 8000	10% PEG 1000	entfällt		entfällt

## 7.1.5 JBScreen classic 5

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
12% PEG 8000	5% Glycerin	entfällt		100mM KCl
12% PEG 8000	10% Glycerin	entfällt		500mM KCl
15% PEG 8000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15% PEG 8000	500mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt		entfällt
15% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Na-Acetat
15% PEG 8000	entfällt	entfällt		50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Ca-Acetat
18% PEG 8000	2% 2-Propanol	100mM Na-HEPES	7,5	100mM Na-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 8000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Mg-Acetat
20% PEG 8000	entfällt	100mM CHES	9,5	entfällt
22% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 8000	entfällt	entfällt		200mM LiCl
30% PEG 8000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8% PEG 10000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
14% PEG 10000	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
16% PEG 10000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt



18% PEG 10000	20% Glycerol	100mM Tris-HCl	8,5	100mM NaCl
20% PEG 10000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 10000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
10% PEG 20000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
17% PEG 20000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	100mM MgCl <sub>2</sub>
20% PEG 20000	entfällt	entfällt		entfällt

#### 7.1.6 JBScreen classic 6

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
0,5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt		100mM Na-Citrat
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	1M Na-Acetat	4,6	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% PEG 400	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3% 2-Propanol	entfällt		50mM Na-Citrat
1,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15% Glycerol	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500mM LiCl	entfällt		entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt		entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM NaCl
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% PEG 1000	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,8M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2M NaCl	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5% PEG 400	100mM Na-MES	6,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
2,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20% Glycerol	entfällt		entfällt
2,4M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		100mM Na-Citrat
3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1% MDP	entfällt		entfällt
3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10% Glycerol	entfällt		entfällt
3,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
3,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1% MDP	100mM Na-MES	6,5	entfällt
3,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt

#### 7.1.7 JBScreen classic 7

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
10% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM Na-Citrat
12% MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	50mM MgCl <sub>2</sub>
15% MDP	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	20mM CaCl <sub>2</sub>
15% MDP	5% PEG 4000	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt

15% MDP	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM NH <sub>4</sub> -Acetat
15% MDP	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Mg-Acetat
15% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
20% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM Na-Citrat
20% MDP	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
20% MDP	4% Glycerol	entfällt		200mM NaCl
30% MDP	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	20mM CaCl <sub>2</sub>
30% MDP	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM NH <sub>4</sub> -Acetat
30% MDP	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Mg-Acetat
30% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	500mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
30% MDP	5% PEG 4000	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% MDP	10% PEG 4000	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
30% MDP	20% Ethanol	entfällt		entfällt
35% MDP	entfällt	entfällt		entfällt
35% MDP	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
40% MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
47% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
47% MDP	2% tert-Butanol	entfällt		entfällt
50% MDP	entfällt	entfällt		entfällt

### 7.1.8 JBScreen classic 8

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
50% MDP	15% Ethanol	entfällt		10mM Na-Acetat
50% MDP	20% 2-Propanol	entfällt		50mM NaCl
50% MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
55% MDP	entfällt	entfällt		entfällt
60% MDP	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	10mM CaCl <sub>2</sub>
60% MDP	entfällt	entfällt		20mM Na-Acetat
70% MDP	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
70% MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% Methanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM CaCl <sub>2</sub>
2% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
5% Ethanol	5% MDP	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
5% Ethanol	5% MDP	100mM Tris-HCl	8,5	200mM NaCl
10% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
12% Ethanol	4% PEG 400	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
14% Ethanol	5% Glycerol	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
18% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% Ethanol	entfällt	entfällt		entfällt
20% Ethanol	10% Glycerol	entfällt		entfällt
30% Ethanol	10% PEG 6000	entfällt		100mM Na-Acetat
45% Ethanol	entfällt	entfällt		entfällt
50% Ethanol	entfällt	entfällt		10mM Na-Acetat
60% Ethanol	1,5 % PEG 6000	entfällt		50mM Na-Acetat

60% Ethanol	entfällt	entfällt		100mM NaCl
2% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM MgSO <sub>4</sub>

### 7.1.9 JBScreen classic 9

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
5% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM CaCl <sub>2</sub>
10% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
10% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM MgCl <sub>2</sub>
12% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	50mM NaCl
15% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Na-Citrat
15% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
15% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
15% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Acetat
20% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM CaCl <sub>2</sub>
20% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
25% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM MgCl <sub>2</sub>
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Na-Citrat
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Acetat
25% tert-Butanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	100mM CaCl <sub>2</sub>
35% tert-Butanol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
200mM KNa-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
200mM Mg-Acetat	entfällt	entfällt		entfällt
400mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
400mM KNa-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
400mM KNa-Tartrat	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
500mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		200mM Na-Citrat

### 7.1.10 JBScreen classic 10

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
500mM Na-Acetat	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
700mM Na-Citrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
700mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
800mM KNa-Tartrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM NiCl
1M Na-Acetat	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
1M Na-Formiat	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,4M Na-Acetat	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt

1,4M Na-Citrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,5M Na-Citrat	entfällt	entfällt	6,5	entfällt
1,6M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
1,6M KNa-Tartrat	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> )-Formiat	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
2M MgCl <sub>2</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2M NaCl	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Na-Acetate
2M Na-Formiat	entfällt	100mM Na-Acetate	4,6	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30% Glycerol	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
4M NaCl	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
3M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt

#### 7.1.11 JBScreen JCSG ++ 1

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
50% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetate	4,5	200mM LiSO <sub>4</sub>
20% PEG 3000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	5,0	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H-Citrat
30% MDP	entfällt	100mM Na-Acetate	4,6	20mM CaCl <sub>2</sub>
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	5,9	200mM Mg-Formiat
20% PEG 1000	entfällt	100mM Phosphat/ Citrat	4,2	200mM LiSO <sub>4</sub>
20% PEG 8000	entfällt	100mM CHES	9,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	6,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Formiat
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	6,3	200mM NH <sub>4</sub> Cl
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	7,3	200mM K-Formiat
50% MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	6,9	200mM KNO <sub>3</sub>
entfällt	entfällt	100mM Citronensäure	4,0	800mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	6,9	200mM Na(SCN)
20% PEG 6000	entfällt	100mM Bicine	9,0	entfällt
10% PEG 8000	8% Ethylenglycol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
40% MDP	5% PEG 8000	100mM Na-MES	6,5	entfällt
40% Ethanol	5% PEG 1000	100mM Phosphat/ Citrat	4,2	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetate	4,6	entfällt
10% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	7,0	200mM MgCl <sub>2</sub>
20% PEG 6000	entfällt	100mM Citronensäure	5,0	entfällt
50% PEG 200	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
entfällt	entfällt	entfällt		1,6M Na-Citrat
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	8,3	200mM K-Citrat

## 7.1.12 JBScreen JCSG ++ 2

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
20% PEG 8000	entfällt	100mM Phosphat/Citrat	4,5	200mM NaCl
20% PEG 6000	entfällt	100mM Citronensäure	4,0	1M LiCl
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>
10% PEG 6000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	entfällt
800mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	800mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
40% PEG 300	entfällt	100mM Phosphat/Citrat	4,2	entfällt
10% PEG 3000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	200mM Zn-Acetat
20% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
25% Propan-1,2-diol	10% Glycerol	100mM NaK-Phosphat	6,2	entfällt
10% PEG 20000	2% 1,4 Dioxan	100mM Bicine	9,0	entfällt
entfällt	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	2m (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 1000	10% PEG 8000	entfällt		entfällt
24% PEG 1500	20% Glycerol	entfällt		entfällt
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
50% PEG 200	entfällt	100mM NaK-Phosphat	6,2	200mM NaCl
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
70% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
40% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
40% MPD	entfällt	100mM Tris-HCl	8,0	entfällt
25,5% PEG 4000	15% Glycerol	entfällt		170mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
40% PEG 300	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Ca-Acetat
14% 2-Propanol	30% Glycerol	70mM Na-Acetat	4,6	140mM CaCl <sub>2</sub>
16% PEG 8000	20% Glycerol	entfällt		40mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## 7.1.13 JBScreen JCSG ++3

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
entfällt	entfällt	100mM Na-MES	6,5	1M Na-Citrat
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM NaCl
10% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM NaCl
1,26M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
40% MDP	entfällt	100mM CAPS	10,5	entfällt
20% PEG 3000	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	200mM Zn-Acetat
10% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Zn-Acetat
entfällt	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
entfällt	entfällt	100mM Na-MES	6,5	1,6M MgSO <sub>4</sub>
10% PEG 6000	entfällt	100mM Bicine	9,0	entfällt
14,4% PEG 8000	20 Glycerol	80mM Na-MES	6,5	160mM Ca-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	100mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
30% Jeffamine M-600	entfällt	100mM Na-MES	6,5	50mM CsCl <sub>2</sub>

entfällt	entfällt	100mM Citronensäure	5,0	3,15M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20 MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,0	entfällt
20% Jeffamine M-600	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
50% Ethylenglycol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
10% MDP	entfällt	100mM Bicine	9,0	entfällt
entfällt	entfällt	entfällt	7,0	800mM Bernsteinsäure
entfällt	entfällt	entfällt	7,0	2,1M D,L Äpfelsäure
entfällt	entfällt	entfällt	7,0	2,4M Na-Malonat
0,5% Jeffamine ED-2001	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	1,1M Na-Malonat
1% PEG 2000 MME	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	1M Bernsteinsäure
30% Jeffamine M-600	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	entfällt

#### 7.1.14 JBScreen JCSG ++ 4

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% Jeffamine ED-2001	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	entfällt
22% Polyacrylsäure 5100	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
20% Polyvinylpyrrolidon K15	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	100mM CoCl <sub>2</sub>
20% PEG 2000 MME	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Trimethylamin-N <sub>2</sub> oxid
12% PEG 3350	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	5mM Co-, Cd-, Mg-, NiCl
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	7,0	200mM Na-Malonat
15% PEG 3350	entfällt	entfällt	7,0	100mM Bernsteinsäure
20% PEG 3350	entfällt	entfällt	7,0	150mM D,L Äpfelsäure
30% PEG 2000 MME	entfällt	entfällt		100mM K(SCN)
30% PEG 2000 MME	entfällt	entfällt		150mM KBr
entfällt	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
entfällt	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	3M NaCl
entfällt	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	300mM Mg-Formiat
1% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	entfällt
45% MDP	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
45% MDP	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
17% PEG 10000	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	100mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
25% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM NaCl
25% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
25% PEG 3350	entfällt	100mM Bis-Tris	5,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
45% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat

## 7.2 Puffer zur Kristallisierung von der Firma Sigma

### 7.2.1 Sigma Basic Kit

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	20mM CaCl <sub>2</sub>
400mM K/Na-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
400mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
1,4M Na-Acetat	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM NH <sub>4</sub> -Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM NH <sub>4</sub> -Acetat
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Citrat
28% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Mg-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM NH <sub>4</sub> -Acetat
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Mg-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
20% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM CaCl <sub>2</sub>
1M Na-Acetat	entfällt	100mM Imidazol	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM NH <sub>4</sub> -Acetat
20% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Na-Acetat
800mM K/Na-Tartrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 8000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
4M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Formiat	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
800mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	800mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
8% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,4M Na-Citrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	2% PEG 400
20% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	20% 2-Propanol

20% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	10% 2-Propanol
20% PEG 8000	entfällt	entfällt		50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
30% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
200mM Mg-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Zn-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Ca-Acetat
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		2% PEG 8000
15% PEG 8000	entfällt	entfällt		500mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 7.2.2 Sigma Cryo Kit

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,3	20mM CaCl <sub>2</sub>
35% Glycerol	entfällt	entfällt		260mM K-,Na-Tartrat
35% Glycerol	entfällt	entfällt		260mM (NH <sub>4</sub> )PO <sub>4</sub>
1,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25% Glycerol	75mM Tris-HCl	8,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Ca-Citrat
24% PEG 4000	20% Glycerol	80mM Tris-HCl	8,5	160mM MgCl <sub>2</sub>
980mM Na-Acetat	30% Glycerol	70mM Na-Kakodylat	6,5	entfällt
21% 2-Propanol	30% Glycerol	70mM Na-Kakodylat	6,5	140mM Na-Citrat
25,5% PEG 4000	15% Glycerol	85mM Na-Citrat	5,6	170mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
25,5% PEG 4000	15% Glycerol	85mM Na-Acetat	4,6	170mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
700mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30% Glycerol	70mM Na-Citrat	5,6	entfällt
27% 2-Propanol	10% Glycerol	90mM Na-HEPES	7,5	180mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Ca-Citrat
26,6% PEG 400	5% Glycerol	95mM Na-HEPES	7,5	190mM CaCl <sub>2</sub>
25,5% PEG 8000	15% Glycerol	85mM Na-Kakodylat	6,5	170mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,125M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25% Glycerol	75mM Na-HEPES	7,5	entfällt
25,5% PEG 4000	15% Glycerol	85mM Tris-HCl	8,5	170mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
16% PEG 8000	20% Glycerol	80mM Na-Kakodylat	6,5	160mM Mg-Acetat
24% 2-Propanol	20% Glycerol	80mM Tris-HCl	8,5	160mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
20% PEG 4000	20% Glycerol	80mM Na-Acetat	4,6	160mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Mg-Acetat
25,5% PEG 4000	15% Glycerol	85mM Tris-HCl	8,5	170mM Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
14% 2-Propanol	30% Glycerol	70mM Na-Acetat	4,6	140mM CaCl <sub>2</sub>
700mM Na-Acetat	30% Glycerol	70mM Imidazol	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
14% 2-Propanol	30% Glycerol	70mM Na-HEPES	7,5	140mM Na-Citrat
25,5% PEG 8000	15% Glycerol	85mM Na-Kakodylat	6,5	170mM Na-Acetat
520mM K-, Na-Tartrat	35% Glycerol	65mM Na-HEPES	7,5	entfällt



25,5% PEG 8000	15% Glycerol	entfällt		170mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25,5% PEG 4000	15% Glycerol	entfällt		170mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25% Glycerol	entfällt		entfällt
3,6M Na-Formiat	10% Glycerol	entfällt		entfällt
1,4M Na-Formiat	30% Glycerol	70mM Na-Acetat	4,6	entfällt
600mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	600mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	75mM Na-HEPES	7,5	25% Glycerol
5,2% PEG 8000	35% Glycerol	65mM Tris-HCl	8,5	entfällt
5,6% PEG 4000	30% Glycerol	70mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,26M Na-Citrat	10% Glycerol	90mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,7M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,7% PEG 400	85mM Na-HEPES	7,5	entfällt
19% PEG 4000	19% 2-Propanol	95mM Na-Citrat	5,6	5% Glycerol
17% PEG 4000	8,5% 2-Propanol	85mM Na-HEPES	7,5	15% Glycerol
16% PEG 8000	20% Glycerol	entfällt		40mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
24% PEG 1500	20% Glycerol	entfällt		entfällt
50% Glycerol	entfällt	entfällt		100mM Mg-Formiat
14,4% PEG 8000	20% Glycerol	80mM Na-Kakodylat	6,5	160mM Zn-Acetat
14,4% PEG 8000	20% Glycerol	80mM Na-Kakodylat	6,5	160mM Ca-Acetat
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20% Glycerol	80mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20% Glycerol	80mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,6% PEG 8000	20% Glycerol	entfällt		800mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 8000	20% Glycerol	entfällt		400mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 7.2.3 Sigma Low Ionic

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	3,0	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	3,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	3,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	3,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,0	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,5	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,5	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	4,5	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,0	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,5	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,5	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-Citrat	5,5	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-MES	6,0	entfällt

12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-MES	6,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-MES	6,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-MES	6,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Bis-Tris-HCl	6,5	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Bis-Tris-HCl	6,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Bis-Tris-HCl	6,5	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Bis-Tris-HCl	6,5	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Imidazol-HCl	7,0	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Imidazol-HCl	7,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Imidazol-HCl	7,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Imidazol-HCl	7,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Na-HEPES	7,5	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Na-HEPES	7,5	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Na-HEPES	7,5	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,0	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,5	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,5	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	50mM Tris-HCl	8,5	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	Glycin Na-Salz	9,0	entfällt
12% PEG 3350	entfällt	Glycin Na-Salz	9,0	entfällt
20% PEG 3350	entfällt	Glycin Na-Salz	9,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	Glycin Na-Salz	9,0	entfällt
4% PEG 3350	entfällt	Glycin Na-Salz	10,0	entfällt
28% PEG 3350	entfällt	Glycin Na-Salz	10,0	entfällt

#### 7.2.4 Sigma Membrane Proteins

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additiva
12% 2-Methyl-2,4-Pentandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM NaCl
12% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM Zn-Acetat
10% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM NaCl
12% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
18% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM MgCl <sub>2</sub>
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 6000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM NaCl
12% PEG 6000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM MgCl <sub>2</sub>
18% PEG 400	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM NaCl
12% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
12% 2-Methyl-2,4-Pentandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM NaCl

1M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
12% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM NaCl
12% PEG 6000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
4% 2-Methyl-2,4-Pentandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM MgCl <sub>2</sub>
100mM NaCl	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
4% PEG 400	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	100mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM ADA	6,5	entfällt
12% PEG 4000	2% 2-Propanol	100mM ADA	6,5	100mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM ADA	6,5	entfällt
12% PEG 6000	entfällt	100mM ADA	6,5	100mM MgCl <sub>2</sub>
12% 2-Methyl-2,4-Pentandiol	entfällt	100mM ADA	6,5	entfällt
1M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	100mM ADA	6,5	100mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
4% PEG 400	entfällt	100mM ADA	6,5	300mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
500mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100mM Na-HEPES	7,5	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM NaCl
18% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM MgCl <sub>2</sub>
1M K-/Na-Tartrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
18% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% 2-Methyl-2,4-Pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM Na-Citrat
1M Na-Citrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt

### 7.2.5 Sigma Extension Kit

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
2M NaCl	10% PEG 6000	entfällt		entfällt
0,5 M NaCl	entfällt	10mM MgCl <sub>2</sub>		10mM CTAB
25% Ethylenglycol	entfällt	entfällt		entfällt
35% Dioxane	entfällt	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5% 2-Propanol	entfällt		entfällt
1M Imidazol	entfällt	entfällt	7,0	entfällt
10% PEG 10000	10% PEG 8000	entfällt		entfällt
1,5M NaCl	10% Ethanol	entfällt		entfällt
2M NaCl	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM NaCl
1M 1,6-Hexandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	10mM CoCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM CdCl <sub>2</sub>
30% PEG 2000 MME	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM KNa-Tartrat
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
0,5M NaCl	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	2% Polyethylenamin
35% tert-Butanol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
10% Jeffamine M-600	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	10mM FeCl <sub>3</sub>
2,5M 1,6-Hexandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt

1,6M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
2M NaCl	0,1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100mM Na-MES	6,5	0,1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
12% PEG 20000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	10% Dioxane
50mM CsCl <sub>2</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	50mM CsCl <sub>2</sub>
1,8M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	10mM CoCl <sub>2</sub>
30% PEG 5000 MME	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 550 MME	entfällt	100mM Na-MES	6,5	10mM ZnSO <sub>4</sub>
1,6M Na-Citrat	entfällt	entfällt	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	500mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 6000	5% 2-Methyl-2,4-pentandiol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
20% Jeffamine M-600	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM NaCl
2M (NH <sub>4</sub> )-Formiat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1M Na-Acetat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	50mM CdSO <sub>4</sub>
70% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
4,3M NaCl	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 8000	8% Ethylenglycol	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 10000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
3,4M 1,6-Hexandiol	3,4M 1,6-Hexandiol	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
25% tert-Butanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM NiCl <sub>2</sub>
1,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12% Glycerol	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
205 PEG 2000 MME	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM NiCl <sub>2</sub>
20% PEG 550 MME	entfällt	100mM Bicine	9,0	100mM NaCl
2M MgCl <sub>2</sub>	entfällt	100mM Bicine	7,5	entfällt
10% PEG 20000	entfällt	100mM Bicine	9,0	2% Dioxane
15% PEG 20000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	100mM MgCl <sub>2</sub>
20% PEG 20000	entfällt	entfällt		entfällt

### 7.3 Kristallisationspuffer von der Firma Hampton Research

#### 7.3.1 Crystal Screen

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	20mM CaCl <sub>2</sub>
400mM K-/Na-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
400mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
1,4M Na-Acetat	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	entfällt

30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Citrat
28% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Mg-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Mg-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
20% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM CaCl <sub>2</sub>
1M Na-Acetat	entfällt	100mM Imidazol	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
20% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Na-Acetat
800mM K-/Na-Tartrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 8000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
4M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
2M Na-Formiat	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
800mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
8% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,4M Na-Citrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	2% PEG 400
20% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	20% 2-Propanol
20% PEG 8000	entfällt	entfällt		50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
30% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
200mM Mg-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Zn-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Kakodylat	6,5	200mM Ca-Acetat
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		2% PEG 8000
15% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

## 7.3.2 Crystal screen 2

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
2M NaCl	10% PEG 6000	entfällt		entfällt
0,5M NaCl	10mM MgCl <sub>2</sub>	entfällt		10mM Hexadecyltrimethylammoniumbromid
25% Ethylenglycol	entfällt	entfällt		entfällt
35% 1,4 Dioxan	entfällt	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		5% 2-Propanol
1M Imidazol	entfällt	entfällt	7,0	entfällt
10% PEG 8000	10% PEG 1000	entfällt		entfällt
1,5M NaCl	entfällt	entfällt		10% Ethanol
2M NaCl	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM NaCl
1M 1,6-Hexandiol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	10mM CoCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	100mM CdCl <sub>2</sub>
30% PEG 20000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	200mM K-/Na-Tartrat
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	500mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2% Ethylenimin Polymer	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	500mM NaCl
35% tert-Butanol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
10% Jeffamin M-600	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	10mM FeCl <sub>3</sub>
2,5M 1,6-Hexandiol	entfällt	100mM Na-Citrat	5,6	entfällt
1,6M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
100mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
12% PEG 20000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10% Dioxan	100mM Na-MES	6,5	entfällt
30% Jeffamin M-600	entfällt	100mM Na-MES	6,5	50mM CsCl <sub>2</sub>
1,8M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-MES	6,5	10mM CoCl <sub>2</sub>
30% PEG 5000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
25% PEG 5000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	10mM ZnSO <sub>4</sub>
1,6M Na-Citrat	entfällt	entfällt	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	500mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 6000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	5% 2-Methyl-2,4-pentandiol
20% Jeffamin M-600	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	100mM NaCl
2M (NH <sub>4</sub> )-Formiat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1M Na-Acetat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	50mM CdSO <sub>4</sub>
70% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
4,3M NaCl	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 8000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	8% PEG
20% PEG 10000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
3,4M 1,6-Hexandiol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
25% tert-Butanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM NiCl <sub>2</sub>

1,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	12% Glycerol
50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
20% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% PEG 2000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	10mM NiCl <sub>2</sub>
20% PEG 550	entfällt	100mM Bicine	9,0	100mM NaCl
2M MgCl <sub>2</sub>	entfällt	100mM Bicine	9,0	entfällt
10% PEG 20000	entfällt	100mM Bicine	9,0	2% 1,4Dioxan

## 7.4 Kristallisationspuffer vom Institut für Physikalische Biotechnologie, Halle

### 7.4.1 House factorials

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% MDP	entfällt	100mM Na-Acetat	4,6	200mM CaCl <sub>2</sub>
entfällt	entfällt	100mM Na-MES	6,4	100mM K/Na-Tartrat
400mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt	6,4	entfällt
3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Tris-HCl	8,3	entfällt
19% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	190mM Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	200mM MgCl <sub>2</sub>
entfällt	entfällt	100mM Na-HEPES	7,9	1,2M Na-Citrat
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	200mM Na-Citrat	5,6	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,9	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Acetat
1,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-Acetat	5,9	entfällt
2M K/Na-Phosphat	entfällt	100mM Na-HEPES	6,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	8,9	200mM Na-Citrat
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,1	200mM MgCl <sub>2</sub>
29% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	5,9	190mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1M Na-Acetat	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	8,2	entfällt
20% MDP	entfällt	70mM Tris-HCl	6,5	130mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2M K/Na-Phosphat	entfällt	100mM Tris-HCl	6,6	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Acetat
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-Citrat	6,1	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% MDP	entfällt	100mM Na-MES	6,2	entfällt
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,1	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,4	200mM Na-Acetat
1M K/Na-Tartrat	entfällt	100mM Tris-HCl	9,1	entfällt
entfällt	entfällt	100mM Tris-HCl	8,4	200mM CaCl <sub>2</sub>
20% MDP	entfällt	70mM Na-Citrat	6,4	330mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Acetat
entfällt	entfällt	100mM Na-MES	6,9	2M Na-Acetat
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM K/Na-Tartrat
entfällt	entfällt	100mM Na-HEPES	7,7	1M K/Na-Tartrat
30% PEG 400	entfällt	100mM Na-Acetat	4,8	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,3	100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

entfällt	entfällt	100mM Na-MES	6,8	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% Ethanol	entfällt	100mM Na-MES	6,2	200mM NaCl
30% Ethanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% Ethanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,2	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% Ethanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% Ethanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,4	200mM Na-Acetat
29% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	6,9	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,3	entfällt
2M Na-Formiat	entfällt	100mM Na-Acetat	5,3	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	200mM Na-Citrat
20% PEG 4000	10% 2-Propanol	100mM Na-HEPES	7,4	entfällt
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	100mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 4000	200mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100mM Tris-HCl	8,6	entfällt
30% PEG 6000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,2	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,5M Na-Acetat	entfällt	100mM Na-Acetat	6,1	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt	4,9	entfällt
4M Na-Formiat	entfällt	entfällt	8,4	entfällt
1,2M Na-Citrat	entfällt	100mM Na-HEPES	7,9	entfällt
entfällt	entfällt	entfällt	8,2	400mM K/Na-Tartrat
entfällt	entfällt	100mM Tris-HCl	8,2	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% MDP	entfällt	100mM Tris-HCl	8,3	200mM MgCl <sub>2</sub>
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-MES	6,3	200mM Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	6,4	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	5,7	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,0	200mM Na-Citrat
285 PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,2	200mM CaCl <sub>2</sub>
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,3	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% MDP	entfällt	200mM Imidazol-HCl	7,0	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	6,3	200mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
25% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,7	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% MDP	entfällt	100mM Na-MES	6,1	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	200mM CaCl <sub>2</sub>
entfällt	entfällt	100mM Imidazol-HCl	7,6	500mM Na-Acetat
30% MDP	entfällt	100mM Imidazol-HCl	7,2	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
18% 2-Propanol	entfällt	100mM Na-HEPES	6,6	200mM Na-Citrat
30% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	5,9	200mM Na-Acetat
entfällt	entfällt	100mM Na-HEPES	7,6	800mM K/Na-Tartrat
30% PEG 400	entfällt	entfällt	5,7	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 4000	entfällt	entfällt	6,0	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
entfällt	entfällt	entfällt	5,8	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,6M K/Na-Phosphat	entfällt	100mM Na-HEPES	9,0	entfällt
4% PEG 400	entfällt	100mM Tris-HCl	4,8	entfällt
2% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	entfällt



1% PEG 4000	entfällt	100mM Na-HEPES	7,6	1,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Citrat	8,8	entfällt
25% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	6,4	200mM (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
entfällt	entfällt	100mM Na-MES	6,8	1,4M Na-Acetat
20% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,4	200mM Mg-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	100mM Tris-HCl	8,3	200mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% MDP	entfällt	100mM Na-MES	6,4	200mM Mg-Acetat
22% MDP	entfällt	90mM Na-Citrat	6,3	190mM (NH <sub>4</sub> )-Acetat
30% PEG 8000	entfällt	entfällt	6,0	200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8% PEG 8000	entfällt	100mM Tris-HCl	8,5	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	100mM Na-Acetat	4,7	entfällt
20% PEG 8000	entfällt	entfällt	9,4	50mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
30% PEG 1000	entfällt	entfällt	7,2	entfällt
entfällt	entfällt	entfällt	7,3	200mM Mg-Formiat
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,3	200mM Zn-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	100mM Na-MES	6,5	200mM Ca-Acetat
entfällt	entfällt	100mM Na-Acetat	4,5	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2% PEG 8000	1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	6,7	entfällt
9% PEG 8000	860mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	6,7	entfällt
entfällt	1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100mM Na-HEPES	7,7	entfällt
40% MDP	entfällt	100mM Na-HEPES	7,0	100mM Na-Citrat
entfällt	entfällt	100mM Na-HEPES	7,8	1,35M Na-Citrat
2% PEG 400	entfällt	100mM Na-HEPES	7,6	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

## 7.5 Kristallisationspuffer von der Firma Molecular Dimensions

### 7.5.1 Molecular Dimensions Mem Plus

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
entfällt	30% PEG 300	0,1M Na-Acetat	5,0	
0,2M CaCl <sub>2</sub>	15% PEG 400	0,1M HEPES	7,0	
1,65M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% PEG 400	0,1M Tris-HCl	8,0	
1,5M Na-Formiat	30% PEG 400	0,05M Na-Cacodylat	5,5	
0,2M CaCl <sub>2</sub>	30% PEG 400	0,05M Glycin	9,0	
entfällt	33% PEG 550MME	0,05M Na-Acetat	4,3	
0,2M NaCl	30% PEG 600	0,02M Tris-HCl	7,5	0,01M CaCl <sub>2</sub>
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20% PEG 600	0,1M HEPES	7,5	
0,3M LiCl	35% PEG 600	0,02M Tris	6,8	
entfällt	28% PEG 1000	0,06M HEPES	7,0	0,04M Tris-HCl
0,35M NaCl	31% PEG 1000	0,1M Tricin	8,0	
0,2M LiSO <sub>4</sub>	9% PEG 1001	0,1M Na-Citrat	4,0	
0,35M NaCl	28% PEG 1002	0,0125M MOPS	7,0	
entfällt	33% PEG 1500	0,02M Tris	7,5	
0,1M NaCl	33% PEG 1500	0,1M EPPS	8,0	
entfällt	12% PEG 2000	0,1M Na-Cacodylat	6,5	

	12,5% PEG 2000 MME	0,1M Na-Cacodylat	6,5	
entfällt	12,5% PEG 2000 MME	0,02M Tris	7,5	
0,4M NaCl	12,5% PEG 2000 MME	0,02M Tris	7,5	0,025M MgCl <sub>2</sub>
0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	20% PEG 2000	0,05M PIPES	7,5	
0,5M NaCl	28% PEG 2000	0,025M Tris-HCl	8,5	
0,5M MgCl <sub>2</sub>	15% PEG 2000	0,05M Tris	8,5	
0,3M MgCl <sub>2</sub>	28% PEG 2000	0,1M Bicin	9,0	
0,1M LiSO <sub>4</sub>	13% PEG 3000	0,1M ADA	6,6	
0,01M Ca-Acetat	3% PEG 3000	0,1M Tris-HCl	8,5	
0,2M Mg-Acetat	10% PEG 3350	0,1M MES	6,0	
0,2M Mg-Acetat	11% PEG 3000	0,05M Na-Cacodylat	6,5	
0,2M Mg-Acetat	11% PEG 3000	0,1M Bis-Tris	6,5	
0,1M LiCl	14% PEG 4000	0,01M Tris-HCl	7,5	0,025M MgCl <sub>2</sub>
0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14% PEG 4000	0,1M CHES	10,0	
0,15M KNa-Tartrat	20% PEG 4000	0,05M ADA	6,6	
0,7M NaCl	25% PEG 4000	0,14M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7,0	
0,15M Zn-Acetat	13% PEG 6000	0,05M Tris	7,5	
0,2M (NH <sub>4</sub> )Cl	15% PEG 6000	0,15M Tricin	8,0	
entfällt	13% PEG 8000	0,025M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5,1	
0,15M Zn-Acetat	15% PEG 8000	0,08M Na-Cacodylat	6,5	
0,1M Mg-Acetat	30% PEG 8000	0,1M PIPES	6,8	
1,4M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4% 2-Propanol		4,5	0,1M (NH <sub>4</sub> )-Acetat
0,5M Na-Acetat	25% MDP	0,05M Tris-HCl	8,0	
0,001M CaCl <sub>2</sub>	27% MDP	0,1M Bis-Tris	6,0	
0,2M (NH <sub>4</sub> )-Acetat	30% MDP	0,1M Na-Citrat	5,5	
0,2M CaCl <sub>2</sub>	30% 2-Propanol			
1,3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,1M Tris-HCl	8,5	
0,5M NaCl	28% MDP	0,1M Na-Citrat	4,5	
0,2M NaCl	35% MDP	0,1M HEPES	7,0	
0,3M CaCl <sub>2</sub>	entfällt	0,1M PIPES	6,5	
0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25% TEG	0,1M Glycin	3,8	
0,15M MgCl <sub>2</sub>	14% MPEG	0,05M EPPS	8,0	
entfällt	30% PEG 300	0,1M Na-Acetat	5,0	
0,2M CaCl <sub>2</sub>	15% PEG 400	0,1M HEPES	7,0	
1,65M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% PEG 400	0,1M Tris-HCl	8,0	
1,5M Na-Formiat	30% PEG 400	0,05M Na-Cacodylat	5,5	
0,2M CaCl <sub>2</sub>	30% PEG 400	0,05M Glycin	9,0	
entfällt	33% PEG 550MME	0,05M Na-Acetat	4,3	
0,2M KCl	30% PEG 600	0,02M Tris-HCl	7,5	0,01M CaCl <sub>2</sub>
1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20% PEG 600	0,1M HEPES	7,5	
0,3M LiCl	35% PEG 600	0,02M Tris	6,8	
entfällt	28% PEG 1000	0,06M HEPES	7,0	0,04M Tris-HCl
0,35M NaCl	31% PEG 1000	0,1M Tricin	8,0	
0,2M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9% PEG 1001	0,1M Na-Citrat	4,0	
0,35M NaCl	28% PEG 1002	0,0125M MOPS	7,0	
	33% PEG 1500	0,02M Tris	7,5	

0,1M NaCl	33% PEG 1500	0,1M EPPS	8,0	
entfällt	12% PEG 2000	0,01M Na-Cacodylat	6,5	
entfällt	12,5% PEG 2000 MME	0,01M Na-Cacodylat	6,5	
entfällt	12,5% PEG 2000 MME	0,02M Tris	7,5	
0,4M NaCl	12,5% PEG 2000 MME	0,02M Tris	7,5	0,025M MgCl <sub>2</sub>
0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	20% PEG 2000	0,05M PIPES	7,0	
0,5M NaCl	28% PEG 2000	0,025M Tris-HCl	8,0	
0,5M MgCl <sub>2</sub>	15% PEG 2000	0,05M Tris	8,5	
0,3M MgCl <sub>2</sub>	28% PEG 2000	0,1M Bicin	9,0	
0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13% PEG 3000	0,1M ADA	6,6	
0,01M Ca-Acetat	3% PEG 3000	0,1M Tris-HCl	8,5	
0,2M Mg-Acetat	10% PEG 3350	0,1M MES	6,0	
0,2M Mg-Acetat	11% PEG 3000	0,05M Na-Cacodylat	6,5	
0,2M Mg-Acetat	11% PEG 3000	0,1M Bis-Tris	6,5	
0,1M LiCl	14% PEG 4000	0,01M Tris-HCl	7,5	0,025M MgCl <sub>2</sub>
0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14% PEG 4000	0,1M CHES	10,0	
0,15M KNa-Tartrat	20% PEG 4000	0,05M ADA	6,6	
0,7M NaCl	25% PEG 4000	0,14M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7,0	
0,15M Zn-Acetat	13% PEG 6000	0,05M Tris	7,5	0,05M ZnCl <sub>2</sub>
0,2M (NH <sub>4</sub> )Cl	15% PEG 6000	0,15M Tricin	8,0	
	13% PEG 8000	0,025M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5,1	
0,15M Zn-Acetat	15% PEG 8000	0,08M Na-Cacodylat	6,5	
0,1M Mg-Acetat	30% PEG 8000	0,1M PIPES	6,8	
1,4M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4% 2-Propanol		4,5	0,1M (NH <sub>4</sub> )-Acetat
0,5M Na-Acetat	25% MDP	0,05M Tris-HCl/0,1M Imidazol	8,0	
0,001M CaCl <sub>2</sub>	27% MDP	0,1M Bis-Tris	6,0	
0,2M (NH <sub>4</sub> )-Acetat	30% MDP	0,1M Na-Citrat	5,5	
0,2M CaCl <sub>2</sub>	30% 2-Propanol			
1,3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,1M Tris-HCl	8,5	
0,5M NaCl	28% MDP	0,1M Na-Citrat	4,5	
0,2M NaCl	35% MDP	0,1M HEPES	7,0	
0,3M CaCl <sub>2</sub>		0,1M PIPES	6,5	
0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25% TEG	0,1M Glycin	3,8	
0,15M MgCl <sub>2</sub>	14% MPEG	0,05M EPPS	8,0	

### 7.5.2 Molecular Dimensions Mem Start

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	entfällt
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M ADA	6,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	entfällt		entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Tris	8,5	entfällt
1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	entfällt
1M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	entfällt

1M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,6	entfällt
1M MgSO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M ADA	6,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
entfällt	entfällt	0,1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,5	entfällt
entfällt	entfällt	0,5M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5	0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,6	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Tris	8,5	entfällt
2M Na-Formiat	entfällt	entfällt	4,6	entfällt
4M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
1,4M Na-Acetat	entfällt	0,1M MES	6,5	entfällt
1,4M Na-Citrat	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	entfällt
1M KNa-Tartrat	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	entfällt
2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% PEG 400	0,1M Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 400	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,1M MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,6	0,1M NaCl
30% PEG 400	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,6	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	entfällt	0,1m ADA	6,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,2M Na-Citrat
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,1M Zn-Acetat
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	entfällt
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,6	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,6	0,1M NaCl
12% PEG 4000	entfällt	0,1m ADA	6,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	0,1M NaCl
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-HEPES	7,5	0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,2M MgCl <sub>2</sub>
12% PEG 4000	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,2M LiHSO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	entfällt	entfällt		0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 6000	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,1M NaCl
12% PEG 6000	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,1M MgCl <sub>2</sub>
12% PEG 6000	entfällt	0,1M ADA	6,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
12% PEG 6000	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
25 PEG 8000	entfällt	entfällt		1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 8000	entfällt	0,1M MES	6,5	0,2M Na-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	0,1M MES	6,5	0,2M Zn-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	0,1M MES	6,5	0,2M Ca-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	0,1M Tris	8,5	entfällt
10% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

## 7.5.3 Molecular Dimensions Mem Sys

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
2,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	3,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Na-Acetat	4,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	5,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	5,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	5,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
2,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M MES	6,5	entfällt
30% PEG 400	entfällt	0,1M MES	6,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M MES	6,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M MES	6,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M MES	6,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	entfällt	0,1M MOPS	7,0	entfällt
2,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M MOPS	7,0	entfällt
30% PEG 400	entfällt	0,1M HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M HEPES	7,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M HEPES	7,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Tris	8,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Tris	8,5	entfällt
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Tris	8,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M Tris	8,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M CAPSO	9,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,1M NaCl	0,1M CAPSO	9,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
1,5M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	3,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Na-Acetat	4,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	5,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	5,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Na-Citrat	5,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
1,5M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M MES	6,5	entfällt
12%PEG 4000	entfällt	0,1M MES	6,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M MES	6,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M MES	6,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M MES	6,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
12%PEG 4000	entfällt	0,1M MOPS	7,0	entfällt
1,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M HEPES	7,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M MOPS	7,0	entfällt
12%PEG 4000	entfällt	0,1M HEPES	7,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M HEPES	7,5	entfällt
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M HEPES	7,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12%PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M HEPES	7,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
1,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	entfällt	0,1M Tris	8,5	entfällt

12% PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Tris	8,5	entfällt
12% PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Tris	8,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M Tris	8,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
12% PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M CAPSO	9,5	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
12% PEG 4000	0,1M NaCl	0,1M CAPSO	9,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>

#### 7.5.4 Molecular Dimensions Mem Gold

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
2,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,08M Na-Citrat	5,2	entfällt
1,2M Na-Citrat	entfällt	0,01M Tris	8,0	entfällt
24% PEG 4000	entfällt	0,015M Tricin	8,5	entfällt
9,9% PEG 4000	0,36M NaCl	0,015M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7,0	0,1% NaN <sub>3</sub>
27,5% PEG 4000	entfällt	0,01M Tris	8,0	0,3M NaCl
6,6% PEG 6000	entfällt	0,225M MES/Bis-Tris	6,6	entfällt
12% PEG 4000	22% Glycerol	0,1M HEPES	7,5	0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
7,7% PEG 1500	0,02M CaCl <sub>2</sub> /NaCl	0,02M MES	6,5	0,01M MgSO <sub>4</sub>
2,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,05M HEPES	7,5	
1,1M Na-Citrat	entfällt	0,0665M HEPES	7,5	
3,3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entfällt	0,15M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,5	
14% PEG 5000 MME	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,8	0,1M Mg-Acetat
11% PEG 3350	entfällt	0,02M Na-Citrat	5,6	0,1M NaCl
5,5% PEG 3350	entfällt	0,02M Na-Citrat	5,6	0,1M NaCl
32% PEG 400	0,05M BaCl <sub>2</sub>	0,1M Tris	8,2	0,05M CaCl <sub>2</sub>
16% PEG 4000	entfällt	0,1M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,2	0,05NaCl
19% PEG 4000	entfällt	0,03M Tris-HCl	8,2	0,1M MgCl <sub>2</sub>
13% PEG 4000	entfällt	0,025M HEPES	7,5	0,2M NaCl
11% PEG 3350	entfällt	0,1M HEPES	7,5	entfällt
6,6% PEG 4000	entfällt	0,02M KMES	6,7	0,1M NaCl
20% PEG 4000	entfällt	0,02M Tris	7,0	0,1M KCl
6,6% PEG 3350	0,05M MgCl <sub>2</sub>	0,1M Na-Cacodylat	6,7	0,1% NaN <sub>3</sub>
37% Pentaerythriolpropoxylat	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,5	0,2M KCl
5,5% PEG 4000	entfällt	0,1M Tris	8,0	entfällt
7,7% PEG 4000	entfällt	0,02M Tris	7,0	0,1M NaCl
22% PEG 400	entfällt	0,1M Tris	7,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
27% PEG 350 MME	entfällt	0,04M Tris	8,0	0,04M NaCl
22% PEG 400	0,05M NaCl	0,1M Na-Citrat	6,0	0,02M MgCl <sub>2</sub>
8,8% PEG 2000 MME	entfällt	0,1M Na-Acetat	5,5	entfällt
13% PEG 2000 MME	entfällt	0,4M (NH <sub>4</sub> )-Acetat	8,0	entfällt
15% PEG 2000	entfällt	0,02M Bis-Tris	7,0	entfällt
11% PEG 1500	0,1M NaCl	0,02M Tris	7,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
11% PEG 1500	0,1M NaCl	0,1M HEPES	8,0	0,1M MgCl <sub>2</sub>
22% PEG 3000	0,2M Na-Acetat	0,1M HEPES	7,0	0,2M KCl
33% Jeffamin M600	entfällt	0,01M HEPES	7,0	0,02M Ni <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
13% PEG 6000	entfällt	0,1M Tris	8,0	0,15M NaCl
53% PEG 400	entfällt	0,1M HEPES	7,5	0,2M CaCl <sub>2</sub>

28% PEG 400	entfällt	0,05M Na-Acetat	5,0	0,05M Mg-Acetat
22% PEG 4000	entfällt	0,05M HEPES	7,5	entfällt
44% PEG 400	entfällt	0,1M Tris-HCl	8,0	0,2M CaCl <sub>2</sub>
24% PEG 400	entfällt	0,05M Na-Acetat	5,4	0,05M Mg-Acetat
26% PEG 350 MME	entfällt	0,1M MES	6,5	0,2M CaCl <sub>2</sub>
39% PEG 400	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,1M KCl
22% PEG 400	entfällt	0,1M Glycin	9,0	0,05M MgCl <sub>2</sub>
28% Triethylenglycol	entfällt	0,1M Glycin	3,8	0,1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
18% PEG 3350	entfällt	0,1M HEPES	7,2	0,15M Na-Formiat
8,8% PEG 6000	entfällt	0,2M Na-Acetat	6,8	entfällt
18% PEG 6000	entfällt	0,1M MES	6,5	0,2M KCl
35% PEG 400	entfällt	0,1M Tris	8,0	0,22M Na-Citrat
17% PEG 400	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,5	entfällt
1,8% PEG 8000	1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,02M Tris	8,5	entfällt
22% PEG 550 MME	entfällt	0,02M Tris	7,5	entfällt
33% PEG 1000	entfällt	0,02M Glycin	10,0	0,05M NaCl
25% PEG 4000	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,2M MgCl <sub>2</sub>
31% PEG 2000	entfällt	0,1M Na-Cacodylat	6,5	0,2M MgCl <sub>2</sub>
18% PEG 3350	entfällt	0,64M Na-Acetat	4,6	entfällt
33% PEG 400	entfällt	0,1M Tris-HCl	8,0	0,1M NaCl
31% PEG 2000	entfällt	0,1m Bicin	8,9	entfällt
35% PEG 400	entfällt	0,05M Tris	8,5	0,05M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
33% PEG 300	entfällt	0,05M Glycin	9,5	0,1M NaCl
23% PEG 2000	entfällt	0,1M Tris	8,0	0,3M Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
20% PEG 300	entfällt	0,02M Tris	7,5/5,0	0,12M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20% PEG 400	entfällt	0,12M Tris	9,4	0,1M NaCl
22% PEG 550 MME	entfällt	0,1M HEPES	7,0	0,2M NaCl
21% PEG 400	0,325M Na-Acetat	0,1M Tris	8,0	0,1M NaCl
18% PEG 2000	entfällt	0,08M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,2	0,02M Na-Citrat
7,7% PEG 4000	entfällt	0,03M K-Citrat	6,5	0,02M KNO <sub>3</sub>
30% PEG 2000 MME	0,05M MgCl <sub>2</sub>	0,1M Tris	8,5	0,1M NaCl
33% PEG 400	entfällt	0,1M HEPES	7,0	0,2M CaCl <sub>2</sub>
13% PEG 2000 MME	entfällt	0,1M Tris	6,5	0,1M CaCl <sub>2</sub>
33% PEG 200	0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,02M Na-Acetat	4,0	0,02M NaCl
22% PEG 400	entfällt	0,05M Na-Citrat	4,5	0,07M NaCl
28% PEG 550MME	entfällt	0,1M Na-Acetat	4,6	0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
55% PEG 400	entfällt	0,05M Glycin	9,0	entfällt
33% PEG 400	entfällt	0,1M Tris	8,5	0,1M MgCl <sub>2</sub>
19% PEG 1000	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,05M Zitronensäure		0,05M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
33% PEG 400	0,2M MgCl <sub>2</sub>	0,025M Na-Citrat	4,0	0,1M KCl
11% PEG 8000	entfällt	0,05M MES	6,1	0,05M Zn-Acetat
22% PEG 8000	entfällt	0,1M Tris	8,0	0,3M Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
33% PEG 400	4% Ethylenglycol	0,1M MES	6,5	0,1M NaCl
26% PEG 400	entfällt	0,1M Na-Citrat	5,5	0,05M NaCl
30% PEG 400	entfällt	0,1M Glycin	9,3	0,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
22% PEG 6000	0,15M K-Citrat	0,1M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		0,05M Li-Citrat

28% PEG 600	entfällt	0,05M HEPES	7,8	0,001M ZnSO <sub>4</sub>
33% PEG 300	entfällt	0,1M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7,0	0,1M NaCl
33% PEG 300	entfällt	0,05M Bicin	9,0	0,1M NaCl
6,6% PEG 8000	6% Ethylenglycol	0,1M Na-Cacodylat	6,0	0,05M Zn-Acetat
28% PEG 400	entfällt	0,1M Na-Citrat	3,5	0,2M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
11% PEG 4000	entfällt	0,1M Tris	7,5	0,1M NaCl
7% PEG 3000	entfällt	0,1M Tricin	7,4	0,05M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
33% PEG 400	entfällt	0,1M MES	6,5	0,2M CaCl <sub>2</sub>
28% PEG 4000	entfällt	0,1M Na-Citrat	6,0	1M NaCl
11% PEG 4000	entfällt	0,1M HEPES	7,5	entfällt
25% Jeffamin ED2001	entfällt	0,08M HEPES	7,0	0,002M ZnSO <sub>4</sub>
30% PEG 400	0,03M MgCl <sub>2</sub>	0,1M MES	6,5	0,001M CdCl <sub>2</sub>
3M NaCl	entfällt	0,1M Bis-Tris Propan	7,0	entfällt

#### 7.5.5 Molecular Dimensions Morpheus

Ligand stock	Konz.	Puffer	Konz.	pH	Präzipitant stock	Konz.
Divalents	0,06M	1	0,1M	6,5	P550MME_P20K	30%
Divalents	0,06M	1	0,1M	6,5	EDO_P8K	30%
Divalents	0,06M	1	0,1M	6,5	GOL_P4K	30%
Divalents	0,06M	1	0,1M	6,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Divalents	0,06M	2	0,1M	7,5	P550MME_P20K	30%
Divalents	0,06M	2	0,1M	7,5	EDO_P8K	30%
Divalents	0,06M	2	0,1M	7,5	GOL_P4K	30%
Divalents	0,06M	2	0,1M	7,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Divalents	0,06M	3	0,1M	8,5	P550MME_P20K	30%
Divalents	0,06M	3	0,1M	8,5	EDO_P8K	30%
Divalents	0,06M	3	0,1M	8,5	GOL_P4K	30%
Divalents	0,06M	3	0,1M	8,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Halogene	0,09M	1	0,1M	6,5	P550MME_P20K	30%
Halogene	0,09M	1	0,1M	6,5	EDO_P8K	30%
Halogene	0,09M	1	0,1M	6,5	GOL_P4K	30%
Halogene	0,09M	1	0,1M	6,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Halogene	0,09M	2	0,1M	7,5	P550MME_P20K	30%
Halogene	0,09M	2	0,1M	7,5	EDO_P8K	30%
Halogene	0,09M	2	0,1M	7,5	GOL_P4K	30%
Halogene	0,09M	2	0,1M	7,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Halogene	0,09M	3	0,1M	8,5	P550MME_P20K	30%
Halogene	0,09M	3	0,1M	8,5	EDO_P8K	30%
Halogene	0,09M	3	0,1M	8,5	GOL_P4K	30%
Halogene	0,09M	3	0,1M	8,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
NPS	0,09M	1	0,1M	6,5	P550MME_P20K	30%
NPS	0,09M	1	0,1M	6,5	EDO_P8K	30%
NPS	0,09M	1	0,1M	6,5	GOL_P4K	30%
NPS	0,09M	1	0,1M	6,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
NPS	0,09M	2	0,1M	7,5	P550MME_P20K	30%
NPS	0,09M	2	0,1M	7,5	EDO_P8K	30%
NPS	0,09M	2	0,1M	7,5	GOL_P4K	30%
NPS	0,09M	2	0,1M	7,5	MPD_P1K_P3350	37,5%



NPS	0,09M	3	0,1M	8,5	P550MME_P20K	30%
NPS	0,09M	3	0,1M	8,5	EDO_P8K	30%
NPS	0,09M	3	0,1M	8,5	GOL_P4K	30%
NPS	0,09M	3	0,1M	8,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Alkohole	0,12M	1	0,1M	6,5	P550MME_P20K	30%
Alkohole	0,12M	1	0,1M	6,5	EDO_P8K	30%
Alkohole	0,12M	1	0,1M	6,5	GOL_P4K	30%
Alkohole	0,12M	1	0,1M	6,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Alkohole	0,12M	2	0,1M	7,5	P550MME_P20K	30%
Alkohole	0,12M	2	0,1M	7,5	EDO_P8K	30%
Alkohole	0,12M	2	0,1M	7,5	GOL_P4K	30%
Alkohole	0,12M	2	0,1M	7,5	MPD_P1K_P3350	37,5%
Alkohole	0,12M	3	0,1M	8,5	P550MME_P20K	30%
Alkohole	0,12M	3	0,1M	8,5	EDO_P8K	30%
Alkohole	0,12M	3	0,1M	8,5	GOL_P4K	30%
Alkohole	0,12M	3	0,1M	8,5	MPD_P1K_P3350	37,5%

Name des Buffersystems	Konzentration	pH	Zusammensetzung
Puffer 1	1M	6,5	Imidazol, MES (acid)
Puffer 2	1M	7,5	Na-HEPES, MOPS (acid)
Puffer 3	1M	8,5	Tris, Bicin (base)

Mix Name	Zusammensetzung
P550MME_P20K	PEGMME 550, PEG 20000
EDO_P8K	Polyethylenglycol, PEG 8000
GOL_P4K	Glycerol, PEG 4000
MPD_P1K_P3350	MPD, PEG 1000, PEG 3350
Mix Name	Zusammensetzung
Divalents	MgCl <sub>2</sub> /CaCl <sub>2</sub>
Halogene	NaF/NaBr/NaI
NPS	NaNO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Alkohole	1,6-Hexandiol, 1-Butanol, 1,2-Propandiol, 2-Propanol, 1,4-Butandiol, 1,3-Butandiol
Ethylenglycol	Di-/Tri-/Tetra-/Penta-ethylenglycol
Monosaccharide	D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose L-Fucose, D-Xylose, N-Acetyl-D-Glucosamin
Carbonsäuren	Na-Formiat, (NH <sub>4</sub> )-Acetat, Na-Citrat, Na-Oxamat, KNaTartrat,
Aminosäuren	L-Na-Glutamat, Alanin, Glycin, Lysin-HCl, Serin

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible] $+$ 

Sigma cryo kit	49 + 50##
----------------	-----------

[illegible]

Sigma cryo + low ionic strength

[illegible]

Jena Bioscience JCSG++ 1,2,3,4

[illegible]

Molecular Dimensions MORPHEUS

[illegible]

## DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Beerhues für die Überlassung dieser interessanten Themen, seine freundliche Unterstützung und Motivation sowie durchgehende Diskussionsbereitschaft.

Herrn PD. Dr. Bernd Schneider danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. (VRC) Dr. Benye Liu (Institute of Botany, The Chinese Academy of Science, Beijing, China) der mich immer mit einem freundlichen Lächeln auf meine Fehler hingewiesen hat und jederzeit für effiziente Diskussionen zur Verfügung stand.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Milton Stubbs und seinem Arbeitskreis am Institut für Physikalische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg für die gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung in die Proteinkristallisation.

Mein Dank gilt weiterhin PD Dr. Bernd Schneider vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena für die sehr zuverlässige Analyse der Diarylheptanoide und die Bereitsstellung von Referenzen und NAC-Estern.

Ein großer Dank geht an Dr. Silke Brand, Dr. Tim Klundt und Dr. Torben Raeth, deren Projekte ich weitergeführt habe. Ohne ihre Vorarbeit wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Meinen Kollegen danke ich für die Unterstützung im Laboralltag und das gute Arbeitsklima.

Besonders erwähnt seien: Andreas Müller, der sich nicht nur permanent um alle aufkommenden Computerfragen gekümmert hat, sondern auch im Labor und bei der Betreuung des Praktikums immer für viel Spaß an der Arbeit gesorgt hat.

Ich danke meinem Kollegen Andreas Müller für die allgegenwärtige Unterstützung, nicht nur für die Rettung in allen Computerfragen inklusive der letzten Minuten vor Abgabe, sondern auch für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre vor allem während der Betreuung des Praktikums.

Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie es mir durch meine Ausbildung ermöglicht haben, diese Doktorarbeit zu schreiben. Meine Eltern und auch meine Großeltern haben mich immer unterstützt und zu höheren Leistungen angespornt. Besonders mein Vater war mir immer ein Vorbild.

Ich danke all meinen Freunden dafür, dass sie sich so gut um die nötige Ablenkung nach Feierabend gekümmert haben und gleichzeitig auch Verständnis dafür hatten, dass es zeitweise keinen Feierabend gab.

Besonders hervorgehoben seien:

Mein guter Freund Ramón Nuppenau, der mich in der Endphase immer wieder auf seine nordisch-minimalistische Art und Weise motiviert hat.

Meiner liebsten Freundin Nora Hristova-Scherl danke ich dafür, dass sie auch in den schweren Zeiten immer an meiner Seite war.

Meinem Freund Björn Oliver Meyer danke ich für die Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit da er bei allen Computerfragen immer ein offenes Ohr für mich hatte. Meinem Freund Tim Posnien wurden im Rahmen dieser Arbeit gleich so viele Aufgaben zuteil, dass ich einfach nur sagen kann: Danke für Alles!

Ein spezieller Dank gilt einer Person, die es hasst namentlich erwähnt zu werden. Trotzdem danke ich Dir dafür, dass du immer da warst, wenn ich Dich brauchte und mich regelmäßig mit dem besten Steak der Welt versorgt hast.